

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Білоцерківський національний аграрний університет
Агробіотехнологічний факультет

Спеціальність 201 «Агрономія»

Допускається до захисту

Завідувач кафедри землеробства, агрохімії та
грунтознавства

д-р с.г наук, професор _____ Леся КАРПУК

«29» жовтня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА
ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У РОЗСАДНИЦТВІ
АРОНІЇ ЧОРНОПІДНОЇ (*ARONIA MELANOCARPA* MICHX.) В
УМОВАХ ТОВ «АГРОФІРМА «БЛАГОДАТНЕ» ЧЕРКАСЬКОЇ
ОБЛАСТІ

Виконав Литвиненко Ярослав Олександрович _____

Науковий керівник, канд. с.г наук Філіпова Л.М. _____

Рецензент, д-р філософії з агрономії Тіта ренко О.С. _____

Я, Литвиненко Ярослав Олександрович, засвідчую, що кваліфікаційну роботу виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності.

Біла Церква – 2024

БЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
АГРОБІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Спеціальність: 201 «Агрономія»

Затверджую

Гарант ОП 201 Агрономія

доктор с.г. наук _____ М.Б. Грабовський

«29» жовтня 2024 р.

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу здобувачу

Литвиненку Ярославу Олександровичу

прізвище, ім'я та по батькові

Тема: Застосування біотехнологічних методів у розсадництві Аронії чорноплідної (*Aronia melanocarpa* Michx.) в умовах ТОВ «Агрофірма «Благодатне» Черкаської області.

Затверджено наказом ректора № 48/С від 07 лютого 2024 р.

Термін здачі студентом готової кваліфікаційної роботи в деканат: до «04» листопада 2024 р.

Перелік питань, що розробляються в роботі.

- визначити оптимальний об'єм культуральних ємностей;
- встановити систему асептики для одержання стерильного матеріалу;
- дослідити вплив трофічних та гормональних детермінант на етапах мультиплікації та ризогенезу;
- вивчити вплив віку донорів експлантів на ризогенез потомства *in vitro*;
- дослідити ефективність різних способів акліматизації та підібрати субстрат
- визначити урожайність зерна озимої пшениці;
- на основі отриманих результатів зробити відповідні висновки та пропозиції;
- опрацювати до 50 літературних джерел та зробити огляд літератури

Календарний план виконання роботи

Етап виконання	Дата виконання етапу	Відмітка про виконання
Огляд літератури	до 06.09. 2024 р.	виконано
Методична частина	до 17.09. 2024 р.	виконано
Дослідницька частина	до 23.10. 2024 р.	виконано
Оформлення роботи	до 31.10. 2024 р.	виконано
Перевірка на плагіат	до 25.10. 2024 р.	виконано
Подання на рецензування	до 31.10. 2024 р.	виконано
Попередній розгляд на кафедрі	28.10. 2024 р.	виконано

Керівник кваліфікаційної роботи _____ доцент Філіпова Л.М.

підпис

Здобувач

_____ Литвиненко Я.О.

підпис

Дата отримання завдання «03» вересня 2023 р.

РЕФЕРАТ

*Литвиненко Ярослав Олександрович. Застосування біотехнологічних методів у розсадництві Аронії чорноплідної (*Aronia melanocarpa* Michx.) в умовах ТОВ «Агрофірма «Благодатне» Черкаської області .*

Досліджено: особливості біотехнологічного методу розсадництва Аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг в умовах ТОВ «Агрофірма «Благодатне» Черкаської області.

Використано: лабораторні методи досліджень, проведено математичну обробку результатів досліджень.

Виявлено: окремі аспекти впливу умов, способів асептики та акліматизації, трофічних та гормональних детермінант на кожному етапі МКР.

Зроблено висновок: мікроклональне розмноження є ефективним способом розсадництва Аронії чорноплідної.

Одержані результати: розширено знання стосовно природних фітогормональних та трофічних детермінант, шляхів асептики, мультиплікації, ризогенезу та акліматизації *in vitro* Аронії чорноплідної; розроблено комплексну технологію мікроклонального розмноження Аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг.

Кваліфікаційна робота магістра містить 65 сторінок, 12 таблиць, 8 рисунків, список використаних джерел із 69 найменувань.

Ключові слова: експлант, регенерант, асептика, мультиплікація, ризогенез, акліматизація.

ANNOTATION

Yaroslav Lytvynenko. Application of Biotechnological Methods in the Nursery of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* Michx.) in the Conditions of LLC "Agrofirma Blahodatne" of the Cherkasy Region.

Researched: study examines the features of the biotechnological method for cultivating black chokeberry varieties Nero and Viking in the conditions of LLC "Agrofirma Blahodatne" in the Cherkasy region

Used: laboratory research methods were used, and mathematical processing of the results was carried out.

Detected: Specific aspects of the impact of conditions, aseptic techniques, acclimatization, and trophic and hormonal determinants at each stage of microclonal reproduction (MCR) were identified.

It was concluded: MCP is an effective method for propagating black chokeberry.

Obtained results: expanded knowledge regarding natural phytohormonal and trophic determinants, aseptic pathways, multiplication, rhizogenesis, and acclimatization in vitro of black chokeberry. A comprehensive microclonal propagation technology for the black chokeberry varieties Nero and Viking has been developed.

Qualification work: the master's thesis contains 65 pages, 12 tables, 8 figures, a list of 69 references.

Key words: explant, regenerant, aseptic technique, multiplication, rhizogenesis, acclimatization.

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 СВІТОВИЙ ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ В РОЗСАДНИЦТВІ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ (огляд літератури)	9
1.1 МКР як форма вегетативного розмноження рослин	9
1.2 Підбір донорів експлантів	10
1.3. Отримання асептичної культури	12
1.4. Гормональна регуляція	14
1.5. Трофічна регуляція	16
1.6. Адаптація регенерантів	17
РОЗДІЛ 2 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ (об'єкт досліджень)	23
2.1. Систематика і номенклатура Аронії чорноплідної	23
2.2. Ботанічна характеристика та біологічні особливості	24
2.3. Господарське значення аронії чорноплідної	26
РОЗДІЛ 3 УМОВИ, МЕТА, ЗАВДАННЯ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
3.1. Основні локації дослідної роботи	29
3.2. Мета, завдання, новизна результатів досліджень	30

3.3	Особливості методики культивування на окремих етапах МКР	30
3.4.	Характеристика сортів Аронії чорноплідної, залучених у дослідження	37
РОЗДІЛ 4	МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ (ARONIA MELANOCARPA MICHX.)	39
4.1.	Підбір культуральних ємностей	39
4.2.	Одержання асептичної культури <i>in vitro</i>	41
4.3.	Трофічна детермінація онтогенезу Аронії чорноплідної	43
4.4.	Гормональна детермінація онтогенезу на етапі мультиплікації	45
4.5.	Детермінація ризогенезу Аронії чорноплідної	50
4.6.	Адаптація регенерантів до умов <i>ex vitro</i>	51
ВИСНОВКИ		55
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ		57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		58

ВСТУП

Біорізноманіття України є цінним національним ресурсом. Збереження, примноження та раціональне використання генетичного різноманіття рослин є важливими чинниками економічної та соціальної стабільності, а також сталого розвитку. Розвиток садівництва значною мірою залежить від інтеграції нових рослин у культуру. Введення нових культур у промислове виробництво і любительське садівництво забезпечує стабільність сільськогосподарського сектору, підвищує його ефективність, зменшує матеріальні та енергетичні витрати, сприяє розвитку екологічно чистого садівництва, поліпшує стан навколишнього середовища, збільшує сировинну базу для переробної промисловості, розширює асортимент продукції і збільшує експортні можливості держави. Вирощування культур з високим вмістом біологічно активних речовин у плодах підвищує якість та харчову цінність садової продукції й перероблених продуктів, що сприяє поліпшенню здоров'я нації [1, 2].

Аронія чорноплідна або горобина чорноплідна (*Aronia melanocarpa* (Michaux) Elliot) рослина родини Розових (Rosaceae Juss.), культивується в Україні як харчова, лікарська і декоративна рослина [3]. Однак за обсягами насаджень аронія відноситься до нішевих малопоширених культур, попит на садивний матеріал якої є ситуативний. Водночас виникають випадки, коли є потреба закласти плантацію, що, в свою чергу, потребує наявності якісного садивного матеріалу. Оскільки попит на саджанці є динамічним і різним по роках, його виробникам не завжди вдається узгодити масштабне виробництво, а потенційним споживачам - придбати саджанці аронії необхідного сорту. Тому актуальним питанням є розробка інструментарію підтримання колекцій маточних рослин та швидкого виробництва необхідної кількості саджанців згідно потреб замовника. Реагувати на зміни попиту ринку дозволяють технології мікроклонального розмноження із коефіцієнтами розмноження в сотні тисяч екземплярів рослин на рік. Умовою цього є наявність у лабораторії комерційного протокола розмноження тієї чи іншої культури та колекції *in vitro*

[4]. Аронію можна легко розмножити насінням, але цей спосіб не рекомендується, оскільки він затримує плодоношення [5, 6]. Найбільшого поширення у промисловому розсадництві та аматорському садівництві набуло вегетативне розмноження рослин зеленими і здерев'янілими стебловими живцями, яке сприяє збереженню біологічних, морфологічних ознак та особливостей форми чи сорту, проте він потребує значних площ і часу [7]. Найпростішим способом розмноження є використання методів *in vitro* за допомогою технології мікророзмноження. Зарубіжні науковці впродовж 30-ти років удосконалюють протокол МКР Аронії чорноплідної [8-11], водночас, в Україні відсутні наукові роботи, присвячені мікроклональному розмноженню аронії, що свідчить про актуальність наших досліджень. Отримані результати представлені на Всеукраїнській науково-практичній конференції здобувачів вищої освіти «Молодь – аграрній науці і виробництву. Інноваційні технології в агрономії, лісовому та садово-парковому господарстві, землеустрої, електроенергетиці», Біла Церква: БНАУ (24 квітня 2024 року) та Всеукраїнській науково-практичній конференції магістрантів і молодих дослідників "Наукові пошуки молоді у XXI столітті", Біла Церква: БНАУ 30 жовтня 2024 року [12, 13].

РОЗДІЛ 1

СВІТОВИЙ ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ В РОЗСАДНИЦТВІ АРОНІЇ ЧОРНОПІДНОЇ

1.1 МКР як форма вегетативного розмноження рослин

Мікроклональне розмноження є специфічною формою вегетативного розмноження, що здійснюється в асептичних умовах. Залежно від потреб виробництва та напрямку діяльності біотехнологічних лабораторій використовуються різні методи МКР. Особливості цих методів пов'язані з вибором оптимальної моделі культивування *in vitro*, що тісно пов'язане з біологічною специфікою рослинних видів. Існують відомі фактори, кожен з яких, окремо або у поєднанні з іншими, впливає на розвиток регенерантів. Найважливішими серед них є: тип експланта, генотип рослини, умови культивування донорських рослин, склад штучних живильних середовищ, фотоперіод та інші.

Біологічні особливості, які склалися еволюційно та під впливом антропогенних факторів, також впливають на онтогенез рослинних об'єктів у зазначених умовах [14]. У культурі *in vitro* виділяють чотири основні етапи: 1. відбір та підготовка донорських експлантів і отримання стерильної культури; 2. прискорене розмноження *in vitro*; 3. індукція коренеутворення (ризогенез); 4. адаптація в умовах *in vivo*. Кожен з цих етапів характеризується своїми методичними підходами та вимогами до середовища, хоча їх об'єднує використання культури *in vitro* [15].

У сучасних дослідженнях також виділяють окремий четвертий етап, під час якого пробіркові рослини переносять із умов *in vitro* для вирощування в ґрунті, що вимагає їх постасептичної адаптації. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) переходять до нестерильних умов (*in vivo*), на початкових етапах вирощування перебувають в умовах *ex vitro* [16].

Реалізація морфогенного потенціалу культивованих тканин визначається багатьма факторами, серед яких виділяють три основні групи: генотип

материнської рослини, тип експланта та умови його культивування. Рослини, які ефективно розмножуються вегетативно, такі як малина, ожина, картопля, лохина та інші, демонструють високу регенераційну здатність у культурі *in vitro*. Серед таких рослин є також аронія чорноплідна. Однак, навіть у межах одного ботанічного виду регенераційна здатність може значно варіювати. Експланти мають різну чутливість до складу живильного середовища та показують відмінності в проліферації калусу і процесах морфогенезу. N. A. Şuţan з співавторами встановили [17], що вплив генотипу виявився надзвичайно важливим у мікророзмноженні *in vitro* сортів чорноплідної горобини «Неро» та «Мелром», які виявляли вищий потенціал клітинної проліферації та регенерації пагонів. Тому у процесі впровадження у промислове виробництво протоколів МКР проводять їх коригування з урахування сортових особливостей видів рослин.

1.2 Підбір донорів експлантів

Ефективність практичного використання матеріалу, розмноженого в штучних умовах, значною мірою залежить від правильного вибору вихідного матеріалу для отримання експлантів. Особливістю культури *in vitro* є можливість застосування для розмноження різноманітних частин рослин, таких як кінчики стебел, бруньки різного походження, зародки та інші меристематичні тканини, а також, у деяких випадках, молоді листки, черешки, суцвіття тощо [18, 19].

Успішність початкових етапів мікроклонального розмноження часто визначається умовами вирощування материнської рослини. Підготовчим етапом є вирощування маточних рослин у віці 1–2 років в умовах закритого ґрунту (депозитарію), де вони отримують розсіяне світло, захищені від природного ультрафіолетового випромінювання та піддаються інтенсивному хімічному захисту від потенційних контамінантів (гриби, бактерії). Основними контамінантами зазвичай є сапрофітна непатогенна мікрофлора, яка може потрапити у живильне середовище з рослинним матеріалом. Первинна обробка та спеціальні умови вирощування в депозитарії знижують забрудненість

експлантів та зменшують виділення ними фенолоподібних речовин у живильне середовище [20, 21].

На успішність первинного культивування впливає пора року, оскільки динаміка фізіологічного стану рослин змінюється відповідно до сезонних змін, зокрема накопиченням ендогенних гормонів [16]. Вміст гормонів у експлантах може варіюватися залежно від типу тканин та розташування органів. Наприклад, у верхівках пагонів міститься більше ауксинів, тоді як у бруньках базальної частини пагона переважають цитокініни. Тотипотентність характерна для всіх рослинних клітин, але її прояви обмежені наявністю морфогенно компетентних клітин, здатних ініціювати розвиток ембріодів, бруньок та пагонів. Найкращими експлантами є меристематичні тканини з високою метаболічною активністю, які розташовані в апексах пагонів, бруньках, а також у основах суцвіть і камбіальних тканинах [22, 23].

Для отримання рослин із меристем найчастіше використовуються експланти конусів наростання пагонів [24, 25]. Ця методика широко застосовується для вирішення практичних завдань, таких як введення рослин у асептичні умови, зокрема з одночасним видаленням вірусів [26]. У фізіології та біохімії апікальних меристем рослин *in vitro* дослідження морфогенезу зосереджені на вивченні переходу меристем із вегетативного в генеративний стан [16]. У культурі *in vitro* верхівкову меристему розглядають як систему, що безпосередньо реагує на зовнішні умови (температура, фотоперіод, освітлення різної інтенсивності та спектру), а також внутрішні стимули (гормони, трофічні речовини), які забезпечують перехід до фази цвітіння [27].

У досліджах з аронією чорноплідної дослідники використовували меристеми бруньок, верхівки пагонів і вузлові частини стебла, взяті з однорічних пагонів [9, 28-30]. Турецькі дослідники [31] нарізали фрагменти пагонів з активноростучих гілок з рослин, що зростали у природних умовах, а також з пророщеного у лабораторних умовах насіння. Потім меристеми, виділені з бруньок однорічних гілок поточної вегетації, вирощували на різних живильних середовищах. Організацію в листову розетку досягали на MSL з додаванням 1,0

мг/л БАП, 0,1 мг/л ІВА, 0,1 мг/л ГА3. Найкращий розвиток і розмноження пазушних бруньок досягали на середовищі MSL з додаванням 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІВА, 0,1 мг/л ГА3. Найкраще вкорінення дало 1,5 мг/л ІМК.

1.3. Отримання асептичної культури

У літературі наголошується на важливості відбору для введення *in vitro* здорового матеріалу, вільного від інфекцій, зокрема вірусних[4, 32, 33]. Проте потенціал вихідного матеріалу не обмежується лише наявністю вірусних захворювань, які є одними з найбільш шкідливих через своє розташування в клітинах. Важливу роль також відіграють фізіолого-біохімічні процеси, що визначають врожайність. Тому експланти слід відбирати не тільки з рослин, перевірених на відсутність інфекцій, а й тих, що мають високий агрономічний потенціал.

Критично важливо, щоб експланти зберігали генетичну ідентичність вихідним рослинам протягом культивування *in vitro*. Вегетативне розмноження передбачає отримання генетично ідентичного матеріалу, тому будь-які спадкові зміни є неприпустимими[34].

Успіх мікроклонального розмноження неможливий без забезпечення стерильності матеріалу та відповідних умов культивування. Від правильного проведення першого етапу залежить можливість використання рослинного об'єкта у селекційних або насінницьких процесах із застосуванням культури тканин. Для введення матеріалу з *in vivo* в асептичну культуру необхідна обов'язкова стерилізація експлантів. Це пов'язано з тим, що поверхня рослин заселена мікроорганізмами, зокрема грибами та бактеріями. Якщо вони потрапляють у штучне живильне середовище, вони поглинають поживні речовини і виділяють токсини, які можуть уповільнювати біологічні процеси в клітинах рослин, а за тривалого впливу – викликати їх загибель [35].

Щоб уникнути цих проблем, застосовується деконтамінація, яка передбачає видалення патогенної екзофітної мікрофлори. Внутрішні тканини здорових рослин зазвичай стерильні, оскільки більшість інфекцій не проникає до

меристематичних тканин через слабо розвинені провідні пучки та вузькі плазмодесми. Верхівкові меристеми також захищені від зовнішнього середовища щільно розташованими листками, які слугують природним бар'єром [16].

Основною умовою успішного асептичного культивування є стерилізація внутрішніх тканин без їх пошкодження.

Ефективність процесу (E) визначають [36] за кількістю неінфікованих експлантів після стерилізації (c) у відсотках до вихідної кількості експлантів, що стерилізувалися (s): $E = (c/s) \times 100 \%$.

Ефективність стерилізуючого засобу визначається його типом, концентрацією, підготовкою експлантів і тривалістю обробки [37]. Також важливими є щільність і чутливість тканин, які взаємодіють з антисептиком. Успішний вибір стерилізуючого агента полягає в тому, щоб він ефективно знищував усі мікроорганізми, при цьому не завдаючи шкоди рослинним тканинам. Не менш важливо забезпечити легке видалення стерилізуючого засобу з експлантів шляхом промивання стерильною водою (як правило, дистильованою і автоклавованою), або щоб агент сам розкладався, як, наприклад, перекис водню [18].

Попередньо перед стерилізацією експланти очищують від бруду, використовуючи миючі засоби або спирт. Для покращення очищення часто додають поверхнево-активні речовини, такі як Твін 20 або Твін 80 [14].

Казахські дослідники [28] довели ефективність стерилізації верхівок пагонів аронії чорноплідної у розчині 0,1 % HgCl_2 протягом 7 хв, що дозволило отримати 50 % життєздатних пагонів.

Celebi-Toprak, F. та Alan, A.R. [11] у своїх дослідженнях з сортами Неро та Вікінг шматочки материнських пагонів аронії занурювали в 70% етанол на 30 с і стерилізували в стерилізаційному розчині впродовж 30 хв. Потім пагони тричі промивали стерильною подвійно дистильованою водою в ламінарному ковпаку.

Після стерилізації регенеранти культивували *in vitro* на штучному живильному середовищі, детермінуючи їх розвиток.

1.4. Гормональна регуляція

Регуляція онтогенезу – це поетапне виконання генетичної програми, яка закладена в кожній клітині організму на різних стадіях його розвитку. У природних умовах (*in situ*) ця програма реалізується поступово: виникають ті ознаки і властивості, які потрібні організму на даному етапі, якщо для цього існують сприятливі умови. В умовах *in vitro* можна керувати цими процесами відповідно до технологічних потреб. Детермінація розвитку означає, що клітина, орган або організм набувають готовності до розвитку у певному напрямку, обмежуючи можливість іншого розвитку. У період детермінації створюються всі необхідні внутрішні умови для подальшої морфологічної реалізації визначеного напрямку.

Ключовими детермінантами є гормональні та трофічні фактори. Вони впливають на зміну активності акцепторів і донорів пластичних речовин у рослині, що призводить до морфологічних змін. Хімічні та фізичні фактори також можуть викликати індукцію, впливаючи на надходження речовин, їх транспорт, метаболізм та морфогенез.

Фітогормони є важливими компонентами живильних середовищ, оскільки їх використання у певних концентраціях дозволяє утримувати клітини в недиференційованому стані або, навпаки, стимулювати диференціацію та морфогенез. Для більшості технологій культивування рослин власних ендогенних гормонів недостатньо, тому у живильні середовища додають штучні регулятори росту, зокрема такі класи фітогормонів, як ауксини, цитокініни, гібереліни та абсцизини.

Різні синтетичні аналоги гормонів в одному класі мають різний вплив на ріст і розвиток об'єктів *in vitro*. Тому більш результативним є використання комбінації кількох екзогенних гормонів в межах одного класу. Наприклад, сумісне застосування ауксинів, таких як індолілмасляна і нафтилоцтова кислоти, або цитокінінів, наприклад, кінетину та БАП, а також гіберелінів ГК4 і ГК7 виявляється більш ефективним, ніж додавання одного гормону окремо.

У дослідях з Аронією сортів Неро та Мелром встановлено, що співвідношення ауксину, цитокініну та гіберелінової кислоти є важливим для підтримки правильного росту пагонів у довжину при послідовних пересадках [17].

I. Rusea з співавторами [38] було досліджено ефективність різних концентрацій N6-бензиламінопурину (BAP), дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-D) та індолмасляної кислоти (IBA) у основних культуральних середовищах Murashige та Skoog (MS) та LeeFossard (LF) відповідно, за вплив на регенерацію адвентивних пагонів чорноплідної горобини сорту Неро. Здатність утворення калюсу та регенерації пагонів із сегментів черешка оцінювали за різними комбінаціями БАП (2,5; 5,0; 10 мг/л), 2,4-Д (0,25; 0,5; 1,0 мг/л) та ІМК (0,25; 0,5; 1,0 мг/л). Найвищий відсоток експлантів черешків чорноплідної горобини, що утворюють калюс (100%), було виявлено при обробці, що містила комбінацію 2,5 мг/л BAP, 0,25 мг/л 2,4-D і 0,25 мг/л IBA. в середовищі MS. Єдина комбінація регуляторів росту, яка призвела до 100% експлантатів черешків, що утворювали калюс на середовищах MS і LF, була 5 мг L-1 BAP, 0,5 мг L-1 2,4-D та 0,5 мг L-1 IBA. Регенерація додаткових пагонів з калюсу, отриманого з черешка, була високою при обробці 10 мг L-1 і 1,0 мг L-1 IBA як на базових середовищах MS, так і на LF. За винятком комбінації цитокінін-ауксин 2,5 мг/л БАП, 0,25 мг/л 2,4-Д і 0,25 мг/л ІМК, регенерація пагонів із черешків сорту Неро. було краще на середовищі MS. Проте найкраща адвентивна регенерація та найбільша кількість пагонів, утворених на експлант, відбувалися шляхом прямого органогенезу. Таким чином, середня кількість 4,3 пагонів на черешковий експлант була досягнута шляхом прямого органогенезу на середовищі MS з додаванням BAP у кількості 5 мг L-1, 0,5 мг L-1 2,4-D та 0,5 мг L-1 IBA.

Н.М.М. Almokaer та L. Pirlak [9] відтворення аронії in vitro за допомогою технології культивування тканин отримано на базальному середовищі, яке поєднувало різні концентрації регуляторів росту (1,0 мг л-1 БК +0,02 мг л-1 ІОК 0,1 мг л-1 GA3) середовищі, де найбільша довжина пагона (14,60 мм) досягнута при обробці. На етапі мультиплікації найбільшу кількість пагонів (64 од.) було

отримано на базальному середовищі MS, що містило комбінацію регуляторів росту в різних концентраціях (2,0 мг л⁻¹ БА +0,01 мг л⁻¹ IAA+0,1 мг л⁻¹ GA3). Для процесу укорінення найбільш придатне базальне середовище MS для довжини коренів, що містить 1,0 мг л⁻¹ концентрації IBA в довжину (18 мм) і найбільшу довжину рослини (33 мм) при 2,0 мг л⁻¹ концентрації IBA.

М. Polat та I. Eskimez [30] у своєму дослідженні встановили вплив різних комбінацій регуляторів росту на мікропропагацію Аронії (*Aronia melanocarpa* (Michx.)). Їх найкращі результати з точки зору кількості рослин на експлантат (4,56 число/експлант), довжини пагонів (20,25 мм/експлант) та кількості вузлів (4,72 число/експлант) були виміряні в середовищі з комбінацією середовища Murashige та Skoog (MS)+1 mgL⁻¹BAP)+0.02 mgL⁻¹IBA) + 1 mgL⁻¹GA (гіберелової кислоти). На етапі ризогенезу встановлено, що такі кореневі характеристики як кореневе число (13,03 число), довжина кореня (23,26 мм) та швидкість вкорінення (90,00 %) формувалися на середовищі, що містить ½ MS+ 1 mgL⁻¹ IBA. Дослідниками було виявлено, що ефекти різних комбінацій слід досліджувати разом, щоб визначити оптимальні концентрації регулятора росту. Тому доцільніше застосовувати різні регулятори росту рослин у середніх випробуваннях. В результаті найкращим середовищем для мультиплікації є середовище, що містить 1 мгЛ: BAP+0.02 mgL⁻¹ IBA+ 1 mgL⁻¹ GA. Найкращим середовищем для вкорінення є середовище, що містить ½ MS+ 1 мгЛ⁻¹ IBA.

D.M. Petrovic з колегами [8] довели можливість розмноження *Aronia melanocarpa* Elliot in vitro на MSL з додаванням 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л IBA, 0,1 мг/л GA3. Найкращий розвиток і розмноження пазушних бруньок досягали на середовищі MSL з додаванням 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л IBA, 0,1 мг/л GA3. Найкраще вкорінення дало 1,5 мг/л ІМК.

1.5. Трофічна регуляція

Окрім гормональної регуляції онтогенезу, велике значення має трофічне регулювання. Воно часто проявляється не тільки у якісному, а й у кількісному аспектах. Трофічна регуляція здійснюється шляхом передачі поживних речовин

і метаболітів між частинами рослинного організму, які виконують як структурну (субстратну), так і регуляторну (каталітичну) функції. Регулювання процесів розвитку відбувається під впливом внутрішніх факторів та умов навколишнього середовища, таких як температура і тривалість світлового дня. В умовах *in vitro* ці чинники мають спільні риси з природними, але також вимагають окремого вивчення. В асептичних умовах трофічними регуляторами розвитку є як мінеральні елементи, так і біологічно активні органічні речовини та компоненти гетеротрофного живлення. Співвідношення асимілятів, макро- та мікроелементів впливає на ріст і розвиток рослин. Важливу роль відіграє не лише наявність певних компонентів у середовищі, але й рівень їх доступності.

Попри постійне вдосконалення штучних живильних середовищ для рослин *in vitro*, їхній склад залишається лише частковим відтворенням природних умов.

Більшість дослідників для вирощування аронії чорноплідної *in vitro* використовували стандартне середовище Murashige та Skoog (MS) [17, 30]. Деякі дослідники для стадії розмноження використовували базальні середовища Driver and Kuniyuki Walnut (DKW) і середовище Woody Plant (WPM) [10, 11], на етапі коренеутворення пропонують використовувати середовища Murashige та Skoog (MS) та LeeFossard (LF) [38], WPM [31].

1.6. Адаптація регенерантів

У сучасних дослідженнях з культури рослинних тканин процес пересадки рослин-регенерантів у природні умови виділяється як окремий етап морфогенезу [16]. Проблеми адаптації виникають через анатомічні та фізіологічні особливості рослин, які розвинулися *in vitro*, формуючи специфічний культуральний фенотип, зокрема стосовно листової морфології [15, 39].

Культивування рослин в умовах *in vitro* призводить до змін у рівнях і співвідношенні фітогормонів і ферментів, що впливає на метаболічні процеси та розвиток органів рослини. [40, 41]. В умовах *in vitro*, де підтримуються стабільні температура і вологість, рослини формують тендітні, невеликі листки, тонкі

стебла та слабо розвинену кореневу систему. Така морфологія листків пов'язана з обмеженістю простору в культуральних ємностях і зниженою потребою у фотосинтезі через часткове гетеротрофне живлення. Поряд із цим, рослини в умовах *in vitro* також отримують живлення автотрофним шляхом, що разом називається міксотрофним живленням. Це означає, що гетеротрофне живлення забезпечується екзогенною сахарозою з живильного середовища, тоді як автотрофне живлення відбувається завдяки фотосинтезу. Однак, культуральні ємності зазвичай герметично закриті (пробками, кришками, фольгою тощо), що призводить до швидкого вичерпання наявного вуглекислого газу, необхідного для фотосинтезу [20].

З часом у процесі культивування *in vitro* відбувається інгібування автотрофного живлення, і домінуючу роль починає відігравати гетеротрофне, яке забезпечується наявністю сахарози в живильному середовищі [42]. Після пересадки рослин у умови *ex vitro* інтенсивність поглинання CO₂ підвищується лише у новоутворених листках, тоді як у листках, сформованих *in vitro*, вона залишається майже незмінною [43]. За методом культури рослин (МКР), рослини-регенеранти часто зберігають ознаки ювенільності, що робить їх більш уразливими до несприятливих умов. У наукових джерелах наведено значні дані про роль хлорофілів у забезпеченні адаптивних властивостей фотосинтезуючих структур за несприятливих екологічних умов. Спостерігаються закономірні зміни кількості хлорофілу в листках на різних етапах онтогенезу та залежно від стадії розвитку листка [44].

Вважається, що співвідношення ауксинів і абсцизинів визначає динаміку фотохімічної активності хлоропластів та інтенсивність фотосинтезу впродовж онтогенезу. Хлоропласти також мають антиоксидантну систему, яка тісно пов'язана з фотосинтезом [16]. Активність і спрямованість процесів у хлоропластах впливають на загальну життєдіяльність рослин і на їх реакцію на екологічні чинники [45]. Важливим фактором для успішної адаптації на етапі пересадки є наявність вологи, яка забезпечує баланс фізіологічних і біохімічних процесів між наземною та кореневою частинами рослин.

Особливості розвитку кореневої системи в умовах *in vitro* також мають важливе значення. Через легкий доступ до води й поживних речовин у штучному середовищі рослини *in vitro* не мають стимулу формувати розвинену кореневу систему. Однак, після пересадки, мінеральні речовини мають надходити через корені, тому їх добре розвинена коренева система є критично важливою для росту й розвитку рослин-регенерантів. При використанні ауксинів іноді утворюється калюс і товсті корені з поганим судинним зв'язком між коренями та пагонами, що ускладнює транспортування поживних речовин. Коренева система, сформована *in vitro*, часто не має корневих волосків і коренів другого порядку, що обмежує її живильну здатність і негативно позначається на адаптації рослин до нових умов [46].

Також, на формування фенотипу *in vitro* впливають умови вирощування, зокрема висока вологість, яка майже повністю насичує повітря. Відсутність градієнту водного потенціалу між випарувальною поверхнею листка і атмосферою в культурі перешкоджає транспірації. Це впливає на зниження водоутримуючої здатності листків через недорозвиненість продохів, слабку кутикулу та знижений осмотичний потенціал. Під час адаптації до специфічних умов *in vitro* рослини виробляють відповідні адаптаційні реакції, але після пересадки в природні умови ці реакції стають шкідливими, призводячи до незворотного зневоднення регенерантів [47].

Зокрема, пересадка зі стабільних умов *in vitro* у нестійкі *in vivo* викликає проблеми з водним обміном. Це пов'язано з морфологічними змінами, характерними для рослин *in vitro*: недостатня кількість кутикулярного воску, слабо розвинена хлоренхіма, низька автотрофна активність і зміни у функціонуванні продихового апарату, що збільшує втрати води [48]. Також відбуваються зміни в гормональному статусі рослин. Якщо в молодих рослин домінують ауксини та цитокініни над абсцизинами, то після перенесення у несприятливі умови кількість абсцизової кислоти (АБК) збільшується [49].

За П. Ворінгом [50], абсцизова кислота відіграє важливу роль у підтримці водного балансу та запобіганні надмірним втратам води. Показано, що

накопичення АБК під час водного стресу корелює з розвитком посухостійкості рослин і залежить від їх сортових особливостей. Менш стійкі до посухи сорти містять більше амідів, ніж стійкі. Поступове зневоднення пагонів спричиняє збільшення рівня АБК в кореневій системі, що покращує водну провідність коренів. Накопичення АБК також пов'язане зі зниженням рівня цитокінінів, які є антагоністами у регулюванні інтенсивності транспірації [51].

Адаптацію рослин до нестатичних умов зазвичай здійснюють у спеціальних спорудах з контрольованим мікрокліматом (кліматокамери, фітотрони, гідро- та аеропонні установки), що дозволяє створити навколо рослини *ex vitro* сприятливий мікроклімат. Протягом 30–50 днів параметри мікроклімату (температура, вологість, освітлення) поступово наближають до умов *in vivo*. Паралельно коригують режими мінерального живлення [16].

Перенесення рослин з умов *in vitro* у *in vivo* є важливим та одним із найскладніших завершальних етапів мікротонального розмноження (МКР). Оптимальний час для пересадки настає, коли коренева система рослини добре розвинута для поглинання мінеральних речовин із ґрунту, а молоді листки можуть здійснювати ефективний фотосинтез. У цей період рослина швидше переходить на автотрофне живлення, стає самостійною і готовою до адаптації в природному середовищі [51].

Існує понад 20 різних субстратів для вирощування рослин, причому часто використовуються їхні суміші [52, 53]. Умовно ці субстрати можна поділити на три основні групи: органічні, мінеральні та синтетичні.

Органічні субстрати. До цієї групи входять матеріали рослинного походження, такі як солома, кокосовий пил, торф, виноградні вижимки, тирса тощо. Вони є порівняно недорогими та не потребують утилізації після використання. Торф — це органічна порода, що утворюється з залишків болотних рослин та продуктів їх неповного розкладу. Найкращим за своїми властивостями вважається торф сфагнуму. Як субстрат також можна використовувати мох сфагнум (*Sphagnum*). Подрібнений сфагнум додають до земляних сумішей або застосовують для укріплення ґрунту, що допомагає

підтримувати стабільну вологість навколо рослин. Крім того, мох добре поглинає надлишок солей і може бути легко замінений при засоленні. Суміші зі сфагнумом мають високу повітро- та вологопроникність, забезпечуючи рівномірне зволоження без застою води та зберігаючи субстрат пухким і легким, що сприяє формуванню коренів у молодих рослин.

Мінеральні субстрати. Для цього використовуються як природні мінерали (наприклад, щебінь, цеоліт), так і продукти їхньої обробки (мінеральна вата, керамзит, вермикуліт, перліт). Всі ці матеріали характеризуються довговічністю, високою інертністю, пористістю та низькою вологоємністю [21]. Мінеральну вату, перліт, вермикуліт і керамзит отримують шляхом нагрівання гірських мінералів до високих температур (понад 1000 °C), що забезпечує знищення всієї патогенної мікрофлори. Після охолодження субстрат запаковують у герметичні плівкові контейнери, де він може зберігати стерильність тривалий час, навіть під час транспортування. Під час нагрівання мінерали розширюються, збільшуються в розмірах і стають легкими та пористими після охолодження. В Україні широко використовують перліт, який отримують шляхом термічної обробки вулканічного піску із закарпатських родовищ при температурах 1000–1200 °C. Він має високі сорбційні властивості, тривалу стерильність, пористість і вологоємність. Недоліком перліту є утворення білого пилу та його крихкість під час вантажно-розвантажувальних робіт.

Ряд зарубіжних дослідників [6, 10] вивчали в умовах *ex vitro* різні варіанти субстратів для Аронії чорноплідної віддають перевагу перлітовому чи торфоперлітовому субстратам, які забезпечували 90 % акліматизованих рослин *ex vitro*.

Celebi-Toprak, F. and Alan, A.R. [11] вкорінені й акліматизовані рослини Аронії сортів «Eastland», «Viking» і «Nero») для подальшого зростання переносили в теплицю.

Молоді листки рослин мають фізіологічні особливості, зокрема відсутність воскового захисного шару, а коренева система недостатньо закріплена в ґрунті й не має розвиненої зони корневих волосків. Це призводить

до порушення водного балансу. Інтенсивна кутикулярна транспірація не компенсується поглинанням води через кореневу систему, що може спричинити в'янення та загибель рослин. Тому в перші тижні після пересадки з умов *in vitro* необхідно забезпечити високий рівень вологості повітря (90–100 %). Для цього використовують установки туманоутворення в теплицях або накривають рослини поліетиленовою плівкою, нетканим матеріалом чи скляним посудом, створюючи умови вологої камери.

Зазвичай високий рівень вологості підтримується до утворення нового листка, що триває близько двох тижнів або більше. Після цього починають загартовувати рослини: поступово знімають покриття та знижують вологість, готуючи їх до умов відкритого ґрунту. На заключній стадії адаптації слід приділяти увагу оптимальному живленню. Надлишкове підживлення може викликати "жирування" рослин, коли вони стають занадто крихкими й погано приживаються після пересадки у відкритий ґрунт.

Якщо адаптація проводиться у великих промислових масштабах, її бажано планувати на період з березня до вересня, щоб мінімізувати витрати. Рослини, отримані взимку, зберігають у прохолоді (+5°...+8 °C) із додатковим освітленням, а навесні виконують всі необхідні операції з пересадки в природні умови.

Отже, за розробки протоколу мікроклонального розмноження рослин, зокрема, Аронії чорноплідної, існує ряд особливостей, які потребують детального вивчення.

РОЗДІЛ 2

БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ

2.1. Систематика і номенклатура Аронії чорноплідної

Аронія (*Aronia* Medik.) – ендемік Північної Америки. Рід об'єднує близько 15 видів і декілька гібридних форм, належить до родини Розоцвітих *Rosaceae* Juss. У флорі Північної Америки трапляються види роду *Aronia* Medik: *A. arbutifolia* (L.) Pers., *A. melanocarpa* (Michx.) Elliott та природний гібрид між ними *A. ×prunifolia* (Marshall) Rehder. Найбільш поширений в декоративному садівництві в Україні вид Аронія чорноплідна (*A. melanocarpa* Elliot.), зустрічаються також ще два види – Аронія червоноплідна (*A. arbutifolia* Elliot.) й Аронія сливолиста (*A. prunifolia* Rehd.) [1, 54].

Унаслідок селекційної роботи Іваном Мічуріним було створено нову плодову культуру — чорнопліду аронію, що походить від *A. melanocarpa* — аронії чорноплодої. Для неї запропонували нову назву *A. mitschurinii* A. K. Skvortsov & Maitul. За результатами досліджень українських науковців (практично всі екземпляри, що культивують в Україні під назвою *A. melanocarpa* в дендрологічних колекціях та садових насадженнях належать не до цього таксону, а є нащадками мічурінської аронії [55].

Проте інші систематики не визнають самостійності *×S. mitschurinii* [56]. За даними Сергія Ковальчука та Володимира Меженського [57] гібридогенна садова аронія, яку вирощують як плодову культуру, відноситься до нотороду *×Sorbaronia*, тобто є горобиноаронією, а не аронією. Таксономічно ці культивовані рослини належать до *×S. mitschurinii* та/або *×S. fallax*. Проте в садівничій практиці для позначення цієї культури можна залишити усталені назви «садова аронія»/ «аронія». Перший українській сорт садової аронії Всеслава фактично є *×S. fallax* на відміну від плодкових сортів, зареєстрованих в інших країнах, які є *×S. mitschurinii*. Його згідно з прийнятою в UPOV

номенклатурою занесено до Державного реєстру сортів рослин України у 2019 р. як *A. melanocarpa* [1].

Наразі Аронія як плодова культура має значення у багатьох країнах Східної, Центральної, Північної Європи та Північної Америки. В Україні культивують тільки один вид – аронію чорноплідну (горобина чорноплідна) – *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot. Існує безліч сортів чорноплідної горобини, всі вони надзвичайно схожі один на одного зовні і відрізняються лише смаковими якостями, термінами плодоношення та іншими властивостями. Селекціонери Данії створили сорт «Арон», Фінляндії – «Ахонена», «Діамант», «Хакки», «Вікінг», «Белдер», «Кархумякі», Польщі – «Кутно», «Дабровіце», «Егерт», «Нова вагу», багато сортів мають змішане походження: «Неро», «Чорноока», «Рубіна», «Еректил», «Грандіфолія», «Алтайська великоплідна», «Зеріна», «Макрофілла», «Отем Мейджік», «Пуміла», «Рубіна», «Естландія» та інші [58].

2.2. Ботанічна характеристика та біологічні особливості

Чорноплідна горобина – це багаторічний густо гіллястий листопадний кущ з гілками різного віку [1]. Висота куща досягає 2–2,5 м, і спочатку він має компактну форму, а з віком стає більш розлогим, складаючись із 8–15 основних гілок. Продуктивний період аронії триває 20–30 років. Іноді аронія зустрічається у вигляді дерева, яке може виростати до 4 м заввишки та має розвинену кореневу систему. Однорічні пагони у неї червоно-бурого кольору. Листя чергове, черешкове, еліптичної або обернено-яйцеподібної форми, з загостреними кінцями, пилчасте по краях, блискуче зверху та світліше знизу, восени стає темно-червоним [54].

Квітки у аронії двостатеві, правильні, п'ятипелюсткові, білі або рожеві, зібрані в щитковидні суцвіття. Цвіте вона з середини травня до кінця червня.

Плоди чорноплідної аронії мають кулясту або сплющено-округлу форму. Спочатку вони зелені та слабоопушені, а коли дозрівають, стають голими, чорними, блискучими, з сизим нальотом. Вага одного плоду становить від 0,6 до 1,5 г. Щільна шкірка сприяє збереженню плодів у свіжому вигляді. М'якуш

фіолетово-червоний, соковитий, кисло-солодкий, з терпкуватим присмаком, містить 4–8 дрібних насінин. Плоди досягають у серпні–вересні і можуть залишатися на куші до приморозків, не осипаючись. Вони мають округлу форму і діаметр 6–12 мм. У свіжому вигляді плоди зберігаються до місяця. Середній урожай з одного куща становить від 0,6 до 1,5 кг, а максимальний, починаючи з п'ятого або шостого року, може досягати 10 кг [59].

Аронія чорноплідна запилюється комахами або вітром. При природному запиленні зав'язується близько 80–90 % плодів від загальної кількості квіток. Пізнє цвітіння аронії допомагає уникнути пошкодження квіток весняними заморозками, що забезпечує стабільне та рясне щорічне плодоношення. Плодоносити аронія починає на четвертому, іноді на третьому році життя. Плоди досягають наприкінці серпня – на початку вересня. У свіжому вигляді вони зберігаються протягом місяця. Середній урожай складає 0,6–1,5 кг, а максимальний, починаючи з п'ятого-шостого року, досягає 10 кг з одного куща [54].

Чорноплідна горобина є світлолюбною культурою. Основна маса плодів розташована на добре освітлених периферійних гілках, а на загущених і затінених кущах урожай помітно знижується.

Аронія вимоглива як до вологості ґрунту, так і до вологості повітря. Високі температури під час літнього періоду, особливо в поєднанні з посухою, негативно впливають на врожайність, а плоди стають менш соковитими, дрібнішають і набувають гірко-терпкого смаку. Водночас аронія не переносить надмірної вологості. Вона не вибаглива до родючості ґрунту, проте на занадто вологих і удобрених ділянках надмірно розростається, що може негативно позначитися на врожайності та зимостійкості.

Аронія чорноплідна — надзвичайно зимостійка культура. За 30 років досліджень у Центральному ботанічному саду АН УРСР не було зафіксовано пошкоджень пагонів чи квіткових бруньок від морозу [1]. Це свідчить про те, що низькі зимові температури не є перешкодою для її широкого вирощування. Крім

того, аронія не страждає від весняних заморозків, які часто шкодять іншим плодово-ягідним культурам.

Плоди аронії дозрівають одночасно, що дозволяє механізувати їх збір. Ягоди відзначаються гарною збереженістю, що робить їх зручними для тривалого зберігання.

2.3. Господарське значення аронії чорноплідної

Аронія чорноплідна — це багатофункціональна рослина, яку культивують як лікарську, плодову, медоносну та декоративну культуру [59, 60]. Завдяки своєму хімічному складу вона стійка до шкідників і хвороб, що робить її особливо підходящою для органічного вирощування.

Особливо цінними є її плоди, з високим вмістом вітаміну Р, якого в аронії вдвічі більше, ніж у чорній смородині, і в 20 разів більше, ніж у лимонах або яблуках. Вітамін Р включає групу флавоноїдів (рутину, цитрину, кверцетину), які знижують проникність судин, особливо в присутності аскорбінової кислоти. Саме тому плоди аронії часто рекомендують приймати разом із іншими лікарськими рослинами, багатими на вітамін С, наприклад, із шипшиною.

Хімічний склад ягід аронії добре збалансований, і вони є багатим джерелом антоціанів та Р-активних речовин. Вміст аскорбінової кислоти в плодах аронії варіюється від 8 до 55 мг на 100 г, бета-каротину — від 1,1 до 2,5 мг на 100 г. Крім того, аронія містить вітаміни В2 (до 0,165 мг на 100 г), Е (0,8–2,2 мг), нікотинову кислоту (0,46–0,64 мг) та фолієву кислоту (1,5 мг на 100 г плодів), а також фосфоліпіди, такі як лецитин і кефалін [61].

У плодах аронії є значна кількість цукру, яка збільшується зі зростанням плодів — від 1,7% у зелених до 8% у зрілих плодах. У зрілих плодах переважає фруктоза, а також міститься глюкоза і сахароза. Дубильні та пектинові речовини надають ягодам їхній специфічний терпкий смак. Вміст пектину становить 1,5–1,7% [62]

Окрім цього, аронія багата на мікроелементи: молібден (0,38–1,88 мг/кг), марганець (3,56–9,64 мг/кг), мідь (0,81–2,97 мг/кг), бор (0,15–0,71 мг/кг),

кобальт, залізо і цинк. Вона також здатна накопичувати значну кількість йоду (6–10 мкг на 100 г плодів), що робить її подібною до фейхоа. Цей показник можна підвищити, удобрюючи рослину йодистим калієм (4–5 г на 0,01 га) [63].

Біологічно активні речовини аронії чорноплідної зосереджені головним чином у шкірці плодів, що важливо враховувати під час їхньої переробки. Ця рослина має загальнозміцнюючу, гіпотензивну, ранозагоювальну, сечогінну та протиалергічну (при зовнішньому застосуванні) дії. Одна з важливих властивостей аронії — здатність нормалізувати рівень холестерину в крові, що робить її ефективною для профілактики та лікування атеросклерозу [64]

Цілющі властивості чорноплідної горобини добре вивчені, і вона активно використовується як у народній, так і в науковій медицині. У науковій практиці плоди застосовують як гіпотензивний, капілярозміцнюючий, сечогінний, жовчогінний та полівітамінний засіб, зокрема для профілактики Р-вітамінної недостатності. Аронія також корисна при атеросклерозі та цукровому діабеті. У народній медицині її рекомендують при гастриті зі зниженою кислотністю, тиреотоксикозі, геморагічному діатезі, гломерулонефриті, а також для лікування променевої хвороби та дерматитів у рентгенологів [65].

Чорноплідна горобина широко використовується в харчовій промисловості для виробництва вітамінних соків, повидла та органічних барвників, а також у лікєро-горілочній продукції. У бджільництві аронія має велике значення завдяки своїм фітонцидним властивостям, що допомагають у профілактиці хвороб бджіл. Вона є добрим медоносом, що дає ранній мед з особливим ароматом, схожим на запах рідкого мигдалю, завдяки триметиламіну. З одного гектара насаджень аронії можна зібрати 50-60 кг меду [1, 63].

Аронія чорноплідна також має важливе значення в ландшафтному дизайні. Її можна зустріти на приватних ділянках, у садах, парках, скверах. Завдяки тривалому періоду цвітіння, красивій формі, насиченому кольору листя і плодів, аронія є декоративним чагарником. Вона підходить як для одиночної, так і для групової посадки вздовж пішохідних і транспортних шляхів. Особливо привабливо виглядає жива огорожа з аронії під час її цвітіння. Крім того, цей

чагарник часто використовують для озеленення територій промислових підприємств та медичних закладів [66].

Отже, невибагливість до умов вирощування, висока зимостійкість, продуктивність та тривалий період використання плантацій, висока цінність, лежкість плодів та широкий спектр застосування роблять Аронію чорноплідну перспективною культурою для вирощування в Україні.

АБТОБНАУ

РОЗДІЛ 3

УМОВИ, МЕТА, ЗАВДАННЯ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Основні локації дослідної роботи

Дослідження за темою кваліфікаційної магістерської роботи проводилися у лабораторії мікроклонального розмноження ТМ Тевітта (м.Шпола Черкаської області). ТМ Тевітта входить у агрохолдинг LNZ GROUP - провідного виробника сільськогосподарської продукції, який працює на технологічній платформі LNZ-Nab та має міні-хаби по всій території України. Спектр товарів і послуг агрохолдинга надзвичайно широкий - вирощування і реалізація садово-ягідної продукції, насіння польових сільськогосподарських культур, агроконсультування та супровід виробників сільськогосподарської продукції, реалізація добрив і засобів захисту рослин тощо. Розсадник ТМ Тевітта внесений до Єдиного реєстру України виробників садивного матеріалу. Одним з напрямків роботи є виробництво якісного садивного матеріалу плодово-ягідних культур з використанням технології мікроклонального розмноження рослин у власній лабораторії (рис. 1).



**Рис. 1. Вирощування садивного матеріалу у лабораторії МКР ТМ
Тевітта ТОВ «Агрофірма «Благодатне»**

3.2. Мета, завдання, новизна результатів досліджень

Основною метою дослідження було створити сучасну технологію виробництва цінного садивного матеріалу Аронії чорноплідної (*Aronia melanocarpa* (Michaux) Elliot) перспективних сортів Неро та Вікінг шляхом розробки ефективного протоколу мікроклонального розмноження. Щоб вирішити цю проблему виконано завдання з розробки регламенту отримання асептичної, вільної від збудників хвороб, шкідників та генетично константної колекції нових сортів, їх мультиплікації, та постасептичної адаптації.

Об'єкт дослідження – технологічний процес мікроклонального розмноження саджанців Аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг. Предмет дослідження – детермінанти онтогенезу рослинних об'єктів.

Новизна та практичне значення отриманих результатів:

1. Розширено знання стосовно природних фітогормональних та трофічних детермінант, шляхів асептики та мультиплікації *in vitro* у розсадництві Аронії чорноплідної.
2. Вперше в Україні розроблено комплексну технологію мікроклонального розмноження Аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг.
3. Регламент технологічного процесу впроваджено в умовах ТМ Тевітта ТОВ «Агрофірма «Благодатне» Черкаської області.

3.3. Особливості методики культивування на окремих етапах МКР

Культивування *in vitro* іронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг (рис. 2) проводилося згідно з стандартними рекомендаціями [15, 39].

У дослідах дотримувалися принципу єдиної логічної відміни. Повторність дослідів чотирикратна в просторі і трикратна в часі. За одне біологічне повторення брали:

- на етапі введення в асептичні умови 50 первинних експлантів;
- на етапах мультиплікації, індукції одна культуральна ємність із 5 регенерантами, як результат бралось середнє по 5 рослинах;



**Рис. 2. Культивування Аронії чорноплідної сорту Неро у лабораторії
МКР ТМ Тевітта**

- на етапі постасептичної адаптації одна теплична касета із 64 комірками.

Визначали ряд біометричних характеристик – висоту регенерантів, кількість мікропагонів у конгломераті, кількість міжвузлів, довжину і кількість коренів тощо, а також показники стерильності та приживлюваності експлантів. Оскільки повний прояв впливу факторів проявляється за 3-5 культивувань [14], обліки проводили після 5-ти послідовних культивувань об'єктів на кожному варіанті середовища.

За мікропагін приймали стебло з листками довжиною понад 1 см. Довжину кореневої системи рахували за самим довгим коренем. Повною фазою розвитку вважали досягнення 3/4 (75 %) об'єктів відповідного стану розвитку. Достовірність даних визначали методами математичної статистики з використанням точкової оцінки показників та методів дисперсійного аналізу.

Послідовність серії досліджень виконана за принципом “steep by steep”, тобто “крок за кроком”, а саме кращий варіант попереднього досліду був контролем в наступному досліді.

Загальновідомо, що етапи МКР характеризуються не лише відмінністю методичних підходів у процесі культивування, але й різними вимогами до навколишнього середовища, хоча спільним для них є використання культури *in vitro*. У сучасних дослідженнях ще виділяють окремо 4 етап, у процесі якого пробіркові рослини переносять з умов *in vitro* для вирощування в ґрунт [16],

тобто вони повинні пройти постасептичну адаптацію. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) перенесені в нестерильні умови (*in vivo*) у процесі їх первинного вирощування характеризуються як умови *ex vitro*. Тому акцентуємо увагу на окремих особливостях МКР Аронії чорноплідної.

Депозитарій. Підготовка маточних рослин та ізоляція первинних експлантів для їх деконтамінації проводилася в умовах депозитарію. Це ізольоване приміщення з контрольованими параметрами (вологість, температура, освітлення) із заходами унеможливлення проникнення, розмноження векторів переносу інфекції. Рослини в депозитарій відбиралися за результатами аналізів на генетичну константність та наявність збудників хвороб. Для цього зразки під шифрами надавалися в три незалежні лабораторії. Рослини висаджували в 10 л контейнери. Освітлення в депозитарію штучне, розсіяне 4000 люкс. В приміщенні проводили фунгіцидні, бактерицидні та інсектицидні обробки та заходи біологічного захисту.

Підготовчі етапи полягали в обробці фунгіцидом Превікур Енерджі 840 SL, РК. Діюча речовина пропамокарб гідрохлорид 530 г/л, фосетил алюмінію 310 г/л. Виробник Байер (Bayer). Для запобігання самоінтоксикації продуктами окиснення фенолів додавали антиоксиданти: полівініл піролідон (1г/л); аскорбінова кислота (3 мг/л).

На перших трьох етапах мікроклональне розмноження проводять в стерильних умовах [18, 20]. Деконтаміновані рослинні об'єкти, вирощувалися і зберігалися в стерильних умовах (в стерильному посуді із стерильним середовищем).

Донори відбирали зі сертифікованого джерела, за умов постійного контролю їх стану здоров'я, генетичної константності та відповідного маркування. Для підвищення ефективності деконтамінації первинних експлантів материнські вихідні рослини за 2-3 тижні обробляли фунгіцидом (Превікур Енерджі 840 SL) і бактерицидом (AgNO_3) та антибіотиком (стрептоміцин). Для ізоляції відбирали пагони візуально вільні від шкідників і хвороб. Відбір проводили на початку пробудження бруньок природним способом.

Для звільнення рослинного матеріалу з якого безпосередньо вичленовувалися первинні експланти (стеблові живці, меристеми) його занурювали в один з розчинів антисептиків: гіпохлорит натрію; сулема; препарат Бланідаз 300. Після обробки антисептиками рослинний матеріал тричі промивали в автоклавованому дистилаті. Потім стерильні донори експлантів переносили в стерильні чашки Петрі.

Для висадки стеблових живців відокремлювали частину пагона із брунькою і переносили на живильне середовище. Вичленення меристемних експлантів розміром 0,15 - 0,20 мм проводили під біокулярним мікроскопом з підсвічуванням ST60-24B2 зі збільшенням 1:40.

Ємності. Рослинні об'єкти (меристемні експланти, живці) висаджували в скляні банки загальним об'ємом 200 (250) мл, закриті прозорими поліпропіленовими кришками, стійкими до автоклавовання твіст-офф, діаметром 66 мм (рис. 3).

Експланти культивували в банках із прозорими поліпропіленовими кришками. Банки заповнювали на 1/5 від загального об'єму штучним агаризованим живильним середовищем (рис. 4).



Рис. 3. Ємності для культивування



Рис. 4. Культивування аронії чорноплідної сорту Вікінг

Мікроклімат. Фотоперіод 16 годин на добу світло, 8 годин темнота. Інтенсивність освітлення 2400 люкс. Спектр холодний білий. Температура 24 ± 2 °C. Вологість 70-80 %. Вентиляція – повний обмін усього об'єму повітря протягом доби з використання системи надлишкового тиску, тобто за добу в приміщення нагнітався рівний або дещо більший об'єм свіжого фільтрованого повітря який дорівнює об'єму культивацийних кімнат (рис. 5).



Рис. 5. Культивацийна кімната

Штучні живильні середовища. У дослідженнях з вивчення трофічної детермінації використано 4 варіанти середовищ (MS – як контроль; 1/2 MS, QL та WPM). Прописи живильних середовищ згідно із [67]. Середовища відрізнялися за умістом мінеральної частини, тобто єдиною логічною відмінністю був різний трофічний комплекс (кількісно і якісно за умістом макро і мікроелементів). Решта компонентів середовищ, зокрема сахароза, вітаміни, гормони були однакові залежно від етапу мікроклонального розмноження.

Стерилізацію повітря проводили бактерицидними лампами, у ламінар-боксі – фільтруванням; живильного середовища та води для деконтамінації – автоклавуванням, інструменти – у стерилізаторі з робочою температурою 250 °C і більше (рис. 6).



Рис. 6. Варіант штучного живильного середовища MS,
Аронія чорноплідна, сорт Неро

На етапі **мультиплікації** маточні рослини живцювали (поділом куща) на середовищі, збагаченому речовинами з цитокініновою активністю (бензил амінопурин, кінетин, аденін). Для **індукції ризогенезу** живцювання проводилося на середовищі, збагаченому синтетичними ауксинами (індолілмасляна та індолілоцтові кислоти) (рис. 7).

Постасептичну адаптацію проводили в умовах звичайних вологих камерах, біореакторі та в умовах періодичного підтоплення (рис. 8).



Рис. 7. Ризогенез Аронії чорноплідної сорту Вікінг



Рис. 8. Постасептична адаптація садивного матеріалу

3.4. Характеристика сортів Аронії чорноплідної, залучених у дослідження

У дослідження залучено два сорти аронії чорноплідної, які є одними з найперспективніших [68].

Сорт Вікінг (фінська селекція) утворює кущ з піднятими пагонами і щільною, густою кроною, що нагадує перевернутий конус. З віком пагони починають злегка нахилитися вниз. Кущ активно утворює кореневі паростки, досягаючи висоти 1-1,5 м і ширини 1,5-2 м, проте його можна формувати як дерево. Спочатку крона компактна, але з часом стає розлогою. Швидкість росту висока, з щорічним приростом близько 0,5 м.

Цвітіння сорту Вікінг відбувається в травні на торішніх пагонах. Квітки білі, діаметром близько 1 см, зібрані в зонтичні суцвіття по 10-20 штук. Листя при розпусканні має оранжево-червоний відтінок, влітку вони еліптичні, темно-зелені та глянцеві зверху, а знизу білуваті та слабкоопушені. Восени листя набуває яскравого червоно-пурпурового забарвлення.

Рясне плодоношення настає у вересні. Плоди пурпурово-чорні, плоско-округлої форми, довжиною 0,8-1,5 см і діаметром 0,7-0,8 см, зібрані в грона. Вони соковиті, кисло-солодкі з невеликим присмаком гіркоти, дозрівають у серпні-вересні, залежно від погодних умов. Плоди багаті на вітаміни, мінерали та антиоксиданти, особливо вітамін С, і використовуються для виробництва соків, сиропів, джемів та настоянок. Вони мають протизапальну, антибактеріальну дію та допомагають підтримувати стабільний рівень глюкози в крові.

Чорноплідна горобина сорту Вікінг невибаглива до ґрунтів і може рости як на вологих, так і на сухих піщаних ґрунтах. Найкращого росту досягає на вологих, добре удобрених ґрунтах. Вона є сонцелюбною, проте може рости в легкій півтіні, стійка до морозів і захворювань.

Саджанці горобини Вікінг підходять для одиночних і групових посадок, живих огорож, а також для озеленення садів, присадибних ділянок і парків.

Сорт Неро (німецька селекція) — великоплідний, морозостійкий, один з найбільш ранніх сортів чорноплідної горобини. Кущ пряморостучий, відносно невеликий, досягає висоти близько 2 метрів, формує компактну крону і має високі темпи росту. Цвіте в травні білими квітками з червоними тичинками, зібраними в численні суцвіття-парасольки. Сорт Неро є хорошим медоносом.

Листя темно-зелене і блискуче в період вегетації, восени стає багряно-червоним і тримається до самого снігу, прикрашаючи сад. Урожай дозріває в серпні-вересні. Ягоди плоско-округлої форми, великі, вагою 1-1,5 грама, синювато-чорні, зібрані в щільні кисті. Смак нагадує чорнослив, практично без терпкості. З одного куща можна отримати до 400 г ягід.

Сорт стійкий до хвороб і шкідників, не зібрані плоди стають їжею для птахів восени. Аронія Неро підходить для ягідного виробництва і ландшафтного дизайну: живі огорожі, одиночні або групові посадки, а також боротьба з ерозією. Рекомендується для садівників та виробничих плантацій, зокрема екологічних.

Плоди аронії Неро багаті на вітаміни, мінерали та антиоксиданти, особливо вітамін С, і використовуються для виробництва соків, сиропів, джемів та настоянок.

РОЗДІЛ 4

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ АРОНІЇ ЧОРНОПЛІДНОЇ (*ARONIA MELANOCARPA MICHX.*)

4.1. Підбір культуральних ємностей

Для оптимізації технології мікроклонального розмноження рослин вагому роль відіграє організація процесу *in vitro*. У цьому контексті з метою економії місця, коштів, легкості виконання окремих операцій з мікроклонального розмноження рослин (миття, стерилізація посуду, посадка і виокремлення експлантів з посуду) важливо, першочергово, підібрати культуральні ємності для здійснення процесу МКР. Нами проведено дослідження з підбору ємностей оптимального об'єму, а також різних варіантів їх герметизації. Класична технологія *in vitro* передбачає вирощування рослин у пробірках (ПБ 20), тому цей варіант слугував контрольним. Досліджено доцільність використання скляних банок об'ємами 200 мл (СК 200) та 250 мл (СК 250) сумісно з пропіленовими (ПК) та металічними кришками (МК), а також поліпропіленових ємностей об'ємом 350 мл (ПП 350).

Щодо питання підбору ємностей оптимального об'єму по обох сортах встановлено (таб. 1), що використання скляних банок об'ємом 250 мл сумісно з пропіленовими кришками твіст забезпечило найкраще співвідношення об'єму та біометричних параметрів регенерантів, які формувалися. Так, по сорту Неро формувалися регенеранти висотою 43,1 мм з кількістю міжвузлів 4,4 шт., по сорту Вікінг відповідно 38, 5 мм та 4,2 шт.

Використання лабораторних пробірок технологічно недоцільне у великих промислових масштабах. Використання скляних банок та металічних кришок забезпечувало витягування регенерантів у висоту, але кількість міжвузлів суттєво зменшувалася. Зменшення розрахункового об'єму ємностей впливало негативно на біометричні показники регенерантів по обох сортах.

У варіанті з використанням поліпропіленових ємностей об'ємом 350 мл у розрахунку 18 мл/регенерант формувалися регенеранти з найменшою кількістю

міжвузлів – 2,8-3,2 шт. Щодо сортових особливостей – сорт Неро характеризувався вищими темпами росту порівняно з сортом Вікінг.

Таблиця 1.

Ефективність культуральних ємностей для культивування експлантів Аронії чорноплідної

Варіант ємності	Кількість регенерантів у ємності, шт	Об'єм ємності у розрахунку на 1 регенерант, мл	Висота регенеранта, мм	Кількість міжвузлів, шт
Сорт Неро				
ПБ 20, контроль	1	20	44,6	4,1
СК250+МК	5	50	71,2	3,8
СК250+ПК	5	50	43,1	4,4
СК 200+ ПК	5	40	40,1	4,0
ПП350	20	18	63,6	3,2
НІР ₀₅			2,4	0,2
Сорт Вікінг				
ПБ 20, контроль	1	20	40,2	3,9
СК250+МК	5	50	67,4	3,6
СК250+ПК	5	50	38,5	4,2
СК 200+ ПК	5	40	34,9	3,6
ПП350	20	18	59,9	2,8
НІР ₀₅			2,5	0,2

Отже, у наступному досліді як культуральна ємність використовувалася скляні банки об'ємом 250 мл сумісно з пропіленовими кришками твіст.

4.2. Одержання асептичної культури *in vitro*

Асептичні методи вирощування рослин були розроблені ще на початку 20-го століття. Застосовуються фізичні методи, наприклад, ультразвукова обробка або ультрафіолетове випромінювання, але хімічна стерилізація рідкими або газоподібними речовинами все ще є найбільш поширеною. Водночас найчастіше для досягнення стерильності експлантів використовують речовини, що містять активний хлор (натрієвий або кальцієвий гіпохлорит, хлорамін, хлорне вапно), ртуть (сулема, етанолмеркурхлорид), кисень (перекис водню), срібло (AgNO_3), спирти (етиловий, ізопропіловий) або їхні комбінації. У випадках глибокої контамінації використовують також фунгіциди та антибіотики.

Результати наших досліджень щодо ефективності різних антисептиків, а також ефективності препаратів для додаткової деконтамінації регенерантів наведено у таблицях 2, 3.

Таблиця 2.

Вплив антисептиків на деконтамінацію регенерантів

Антисептик	Кількість стерильних експлантів, %		Кількість живих експлантів, %	
	Сорт			
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Гіпохлорит натрію (контроль), 2,5 %	16	14	7	6
Хлорид ртуті, 0,1%	24	27	19	19
Діацид 0,2 %	27	25	21	18
Бланідас 300, 0,1 %	41	42	37	38
AgNO ₃ 1,0 %	-	1	13	9
Етанол, 70,0 %	-	-	3	5
H ₂ O ₂ , 3,0 %	-	-	74	66
НІР ₀₅	3,2	3,3	5,1	5,0

Таблиця 3.

Ефективність застосування допоміжних деконтамінант

Антисептик	Кількість стерильних експлантів, %		Кількість живих експлантів, %	
	Сорт			
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Антибіотик				
Без додаткового деконтамінаната (контроль)	41	38	37	36
Стрептоміцин 50 мг/л	59	60	40	38
Казумін 125 мг/л	60	63	43	44
Левоміцетин 125 мг/л	45	42	32	38
Стрептоцид 50 мг/л	40	41	30	38
Фунгіцид				
Превікур Енерджі 3 мл/л	42	42	40	39
Максим 3 мл/л	40	38	33	33
Фундазол 3 мл/л	41	40	30	31
НІР ₀₅	2,2	2,3	2,8	2,9

Концентрація препаратів обиралася з урахуванням рекомендацій виробників.

За результатами наших досліджень оптимальним деконтамінантом для аронії чорноплідної є Бланідас 300 (таб. 2). Внаслідок обробки цим препаратом у обох сортів спостерігалися найвищі показники кількості живих і незаражених регенерантів. Так, кількість стерильних експлантів зростала втричі порівняно з контрольним варіантом, кількість живих експлантів збільшувалася у 6,5 разів. Нітрат срібла, етанол та перекис водню виявилися неефективними для

стерилізації експлантів аронії обох сортів. Діацид та хлорид ртуті були ефективними деконтамінантами порівняно з гіпохлоритом натрію, але за ефективністю дії поступалися препаратом Бланідас 300.

Антибіотики левоміцетин та стрептоцид виявилися неефективними як додаткові деконтамінанти по обох сортах (таб. 3). Аналогічно неефективними було застосування фунгіцидів Максим і Фундазол. До того ж ці препарати негативно впливали на живі тканини, кількість живих експлантів знижувалася на 5-7%.

Найвищу ефективність мав препарат Казумін. Внаслідок його застосування відсоток стерильних експлантів зростав у обох сортів на 19-22 %, кількість живих експлантів збільшувалася на 6-8 %. Не встановлено сортових відмінностей у реакції сортів на досліджувані препарати.

Отже, у наступному досліді для деконтамінації експлантів використовували препарат Бланідас 300, а також як додатковий деконтамінант Казумін.

4.3. Трофічна детермінація онтогенезу Аронії чорноплідної

На етапі мультиплікації успіх культивування напряму залежить від складу живильного середовища. У розділах 1, 3 наведено опис особливостей трофічної детермінації онтогенезу за мікроклонального розмноження рослин, зокрема, Аронії чорноплідної, а також складу живильних середовищ [67]. За результатами наших досліджень з сортами Неро та Вікінг встановлено детермінуючий вплив трофічних чинників (таб. 4). Як фон у живильне середовище додавали бензиламінопурин (БАП) 0,5 мг/л та індолілмасляну кислоти (ІМК) 1 мг/л. Обліки проводили на 30-ту добу культивування.

Зокрема, на варіанті зі середовищем MS встановлено прояв надлишкової дії азоту. За надмірної кількості азотистих сполук має місце гіпергідратація (вітрифікація) тканин. Токсичність надлишку азоту полягає у надмірному осмотичному тиску та інгібуванні інших елементів, що відповідає закону

максимуму, згідно якого надлишок певного елемента живлення зменшує ефективність інших елементів.

Таблиця 4.

Особливості трофічної детермінації онтогенезу аронії чорноплідної *in vitro*

Біометричний показник	MS	MS _{1/2}	QL	WPM
Сорт Неро				
Висота регенеранта, мм	64,5±3,2	73, 9±3,5	84,6±3,9	51,2±4,0
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт	3,6±0,2	5,4±0,3	1,7±0,1	4,6±0,3
Довжина кореневої системи,	31,3±1,8	41, 8±2,4	53,9±2,6	11,0±1,1
Кількість коренів, шт	1,5±0,2	2,3±0,3	2,4±0,3	1,3±0,2
Сорт Вікінг				
Висота регенеранта, мм	69,8±4,0	96±3,8	116,2±4,2	60,0±3,7
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт	2,4±0,1	3,2±0,2	1,2±0,1	1,9±0,1
Довжина кореневої системи,	16,9±0,2	5,0±0,1	7,4±0,2	16,6±0,2
Кількість коренів, шт	1,3±0,1	1,6±0,2	1,9±0,1	1,1±0,1

На середовищі QL встановлено дію надлишку Са та нестачі заліза, оскільки надлишок кальцію призводить до порушення засвоєння інших елементів – азоту, калію, бору і заліза. До того ж кальцій не реутилізується, а накопичується у старих тканинах рослин.

Регенеранти на середовищі WPM мали найменші розміри та ознаки вітрифікації на рослинах.

Оптимальним варіантом живлення було середовище MS_{1/2} (зі зменшеним удвічі умістом макросолей). Отже, для культивування *in vitro* Аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг пропонується живильне середовище MS_{1/2} із додаванням кінетину 1 мг/л та індолілмасляної кислоти 1 мг/л.

4.4. Гормональна детермінація онтогенезу на етапі мультиплікації

Аналогічно у розділах 1, 3 наведено опис особливостей гормональної детермінації онтогенезу за мікроклонального розмноження рослин, зокрема, Аронії чорноплідної. У цьому підрозділі ми зосередимо увагу на власних результатах досліджень з сортами Неро та Вікінг щодо детермінуючого ефекту від гормональних чинників (таб. 5).

Таблиця 5.

Ефективність застосування детермінантів цитокінінового ряду на етапі мультиплікації (на фоні 0,25 мг/л ІМК)

Синтетичний аналог гормону	Висота регенеранта, мм		Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	
	Сорт			
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Без цитокініну (контроль)	93,1	90,4	1,2	1,3
БАП, 1 мг/л	54,6	51,2	5,9	4,6
Кінетин, 1 мг/л	74,6	69,8	4,1	3,7
2-іР , 1 мг/л	88,3	86,6	1,7	1,9
Метатополін, 1 мг/л	86,2	81,4	1.8	1,9
НІР ₀₅	6,5	6,8	0,7	0,6

2-ізопентіладенін (2-іР), ефективний у МКР на представниках верескових, а також препарат Метатополін, що має цитотікінову дію, виявилися неефективними на етапі мультиплікації аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг. Суттєво покращував біометричні показники регенерантів кінетин у концентрації 1 мг/л. У обох сортів зростала кількість мікропагонів у конгломераті – на 2,4 шт у сорту Вікінг та на 2,9 шт у сорту Неро. Найкращі показники висоти та кількості пагонів у конгломераті спостерігалися при застосуванні 1 мг/л БАП. Формувався міцний конгломерат з коротких пагонів, але їх кількість зростала у сорту Неро у 4,9 разів, у сорту Вікінг у 3,5 разів. Також

спостерігалася тенденція кращої реакції сорту Неро на дію фітогормонів цитокінінового ряду.

У досліді з вивчення впливу різних гормональних сполук цитокінінової дії (таб. 6) у різних концентраціях та за умов їх поєднання встановлено, що відсутність у живильному середовищі цитокінінів (контроль) пригнічує процес мультиплікації.

Таблиця 6.

Підбір гормонів цитокінінового ряду

Комбінація компонентів, мг/л	Висота регенеранта, мм		Кількість мікропагонів, шт		Вітрифікован о, %	
	Сорт					
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Без цитокінінів (контроль)	94,3	92,1	1,2	1,3	—	—
БАП 1,0	55,1	52,9	5,9	4,7	6,3	6,0
БАП 1,5	43,1	40,6	6,4	5,8	12,4	9,4
Кінетин 1,0	89,6	87,7	4,0	3,9	1,2	0,8
Кінетин 1,5	83,4	80,5	4,2	4,1	2,6	1,3
БАП 1,0 + Кінетин 1,0	50,6	49,8	4,3	4,1	8,7	3,6
БАП 1,0 + Кінетин 0,5	66,3	62,8	4,1	3,8	7,2	3,1
БАП 0,5 + Кінетин 1,0	79,6	77,4	4,0	4,0	3,4	2,2
БАП 0,5 + Кінетин 0,5	80,2	81,0	3,7	3,2	2,7	2,4
БАП 0,75 + Кінетин 0,25	81,2	76,4	4,4	4,1	1,3	0,4
НІР ₀₅	2,6	2,8	0,04	0,03	0,09	0,08

Як правило, формувалося 1,2-1,3 шт. мікропагонів у конгломераті довжиною 92,1-94,3 см, тобто чітко проявлялася ауксинова дія на регенеранти.

Одноосібне застосування БАП спричинило формування невисоких регенерантів, найбільшу кількість мікропагонів у конгломераті, але водночас, кількість вітрифікованих рослин була найбільшою у обох сортів. До того ж зі збільшенням концентрації ПАБ з 1 мг/л до 1,5 мг/л у сорту Неро удвічі зростала частка вітрифікованих експлантів, тому ми не можемо рекомендувати БАП до застосування у практиці МКР. За застосування одноосібно кінетину відсоток вітрифікації був невисокий, але формувалася незначна (3,9-4,2 шт.) кількість пагонів у конгломераті порівняно з іншими варіантами дослідів зі застосуванням цитокінінів.

Поєднання БАП та кінетину у різних співвідношеннях мало проміжні показники. З досліджених варіантів найвищу ефективність мало сумісне застосування БАП (0,75)+Кінетин (0,25) – у конгломераті формувалося 4,1-4,4 шт. мікропагонів та кількість вітрифікованих рослин була найменшою – 0,4-1,3 %. Щодо сортових особливостей, спостерігалася тенденція до зменшення вітрифікації у рослин сорту Неро порівняно з сортом Вікінг, рослини сорту Неро мали кращі характеристики росту.

Водночас у літературі [69] неодноразово повідомлялося про негативний вплив надлишкового цитокінінового фону за тривалого культивування рослин. Результати наших досліджень з Аронією чорноплідної підтверджують цей факт (таб. 7). Так, впродовж збільшення кількості пасажів з одного до десяти у обох сортів спостерігалася зменшення коефіцієнта розмноження та збільшення кількості вітрифікованих рослин. Щодо ефективності різних гормонів, як і в попередньому досліді ПАБ спричиняв вітрифікацію рослин, (з 6,0 до 23,1 %) застосування кінетину спричиняло зниження показників мультиплікації (з 4,1 до 3,6 %). Найкращим виявився варіант з сумісним застосуванням БАП 0,75 + Кінетин 0,25, у якому нівелювалася негативна тривала дія цитокінінових гормонів на мультиплікацію, спостерігалася оптимальне співвідношення коефіцієнта розмноження та кількості вітрифікованих регенерантів.

Таблиця 7.

Таблиця вплив гормонального цитокінінового фону за вирощування донорів експлантів на ризогенез потомства (+ 1 мг/л ІМК в усі варіанти)

Комбінація цитокінінів	Коефіцієнт розмноження		Вітрифіковано, %	
	Сорт			
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Перший пасаж				
Без цитокінінів (контроль)	1,3±0,1	1,3±0,1	—	—
БАП 1,0	5,8±0,4	4,7±0,3	6,3±0,3	6,0±0,3
Кінетин 1,0	4,1±0,2	4,0±0,2	1,2±0,1	0,2±0,1
БАП 0,75 + Кінетин 0,25	4,4±0,2	4,0±0,2	1,3±0,1	0,3±0,1
П'ятий пасаж				
Без цитокінінів (контроль)	1,1±0,1	1,2±0,1	—	—
БАП 1,0	4,7±0,3	4,4±0,2	11,3±0,4	10,5±0,4
Кінетин 1,0	4,0±0,2	3,7±0,1	4,2±0,2	1,9±0,1
БАП 0,75 + Кінетин 0,25	4,3±0,2	4,0±0,2	5,7±0,3	3,8±0,2
Десятий пасаж				
Без цитокінінів (контроль)	0,7±0,1	1,0±0,1	—	—
БАП 1,0	3,2±0,1	3,1±0,1	23,1±0,7	14,9±0,6
Кінетин 1,0	3,9±0,2	3,6±0,1	5,2±0,4	2,6±0,1
БАП 0,75 + Кінетин 0,25	4,1±0,2	3,8±0,2	6,3±0,3	3,8±0,2

Отримані результати досліджень свідчать про необхідність застосування «розвантажувальних» середовищ впродовж тривалого культивування рослинних

об'єктів, для підтримання колекцій тощо. Особливістю таких середовищ є зменшення у їх складі вмісту гормонів. Так, у нашому розвантажувальному середовищі вміст гормонів становив: кінетин 0,1 мг/л, ІМК 0,1,мг/л, гіберелін (ГКЗ) 0,1 мг/л. Результати ефективності розвантажувальних середовищ з різною періодичністю їх застосування впродовж 12 пасажів (12 місяців культивування) наведено у таблиці 8.

Таблиця 8.

Вплив розвантажувальних середовищ на стан регенерантів за тривалого культивування (01.10 2023-01.10.2024)

Періодичність застосування розвантажувальних середовищ	Коефіцієнт розмноження		Вітрифікованих, %	
	Сорт			
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Беззмінне культивування (контроль)	4,0	3,4	7,7	6,9
Кожне п'яте розвантажувальне	4,6	4,0	1,7	1,1
Кожне десяте розвантажувальне	4,1	3,7	6,3	6,2
НІР ₀₅	0,02	0,03	0,04	0,03

Доведена ефективність застосування розвантажувальних середовищ через кожні 4 пасажі. Кожне п'яте пасажування на розвантажувальному середовищі сприяло збільшенню коефіцієнта розмноження на 0,6 од. та водночас зменшенню кількості вітрифікованих рослин на 5,8-6,0 %. Застосування розвантажувальних середовищ з більшою періодичністю (кожне десяте) виявилось неефективним щодо впливу на коефіцієнт розмноження, показник вітрифікації зменшувався до 6,2-6,3 %, але значно поступався варіанту з застосуванням «кожного п'ятого розвантажувального середовища». Отже, щодо періодичності розвантажувальних середовищ доцільно їх застосовувати через кожні чотири пасажі на «повноцінних» середовищах.

4.5. Детермінація ризогенезу

Коренеутворення у регенерантів за мікроклонального розмноження значною мірою залежить від донорних рослин, зокрема їх віку та умов вирощування. Результати наших досліджень з приводу вивчення цих чинників наведено у таблицях 9, 10. Щодо впливу гормонального фону за вирощування донорних рослин на показники ризогенезу потомства встановлено, оптимальним є варіант зі застосуванням кінетину 1,0 мг/л. За такої концентрації гормону поєднувалися високий коефіцієнт розмноження донорів і добрий ризогенез у потомства.

Таблиця 9.

Вплив умов вирощування донорів експлантів на ризогенез потомства
(фон 1 мг/л ІМК)

Комбінація гормонів за вирощування донорів (мг/л)	Показники потомства регенерантів					
	Коефіцієнт розмноження		Кількість коренів, шт.		Довжина коренів, мм	
	Сорт					
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Без гормонів (контроль)	1,1	1,0	1,6	1,3	53,5	47,6
БАП 1,0	4,0	3,6	4,4	4,0	21,6	20,8
Кінетин 1,0	3,4	3,3	4,1	4,1	49,6	44,7
БАП 0,75 + Кінетин 0,25	3,7	3,4	4,3	4,0	31,2	29,6
НІР ₀₅	0,02	0,03	0,03	0,04	1,5	1,3

Щодо впливу тривалості культивування донорів експлантів на ризогенез потомства встановлено ефективність використання донорів віком 45 та 60 діб. У регенерантів, отриманих з таких донорів, раніше починалося коренеутворення та

на 30-ту добу культивування формувалася розвинута коренева система з 4,0-4,3 шт корінців довжиною 43,9-50,7 см.

Таблиця 10.

Вплив віку донорів експлантів на ризогенез потомства регенерантів

Вік донора, діб	Початок коренеутворення, доба		Довжина коренів на 30-ту добу культивування, мм		Кількість коренів на 30-ту добу культивування, шт.	
	Сорт					
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
20	19,6	20,4	2,6	2,0	2,1	1,8
30	16,6	19,2	23,4	21,7	3,4	3,1
45	12,4	16,6	50,1	43,9	4,2	4,0
60	12,1	15,9	50,7	44,4	4,3	4,0
НІР ₀₅	0,6	0,8	1,5	1,4	0,03	0,02

Використання донорів віком 20 діб несприятливо позначалося на ризогенезі потомства, суттєво відставав початок коренеутворення (на 4-7 діб), тому на момент обліків (30-ту добу) на рослині формувалося у середньому 2 корені довжиною 2-2,6 мм. Використання донорів віком 30 діб забезпечувало проміжні результати показників ризогенезу, але поступалося донорам старшого віку. Якщо порівнювати ефективність донорів 45 і 60 діб, то економічно вигіднішим є варіант використання донориз рослин віком 45 діб (скорочення терміну культивування донора зменшує матеріальні витрати, прискорює одержання потомства).

4.6. Адаптація регенерантів до умов *ex vitro*

Адаптація рослин-регенерантів до умов вирощування *ex vitro* є завершальним етапом методу культури рослин (МКР). Недосконалі технологічні прийоми на цьому етапі значно знижують ефективність розмноження *in vitro*. Тому важливо вдосконалювати процес адаптації регенерантів, як для окремих цінних екземплярів, так і в умовах масового промислового виробництва.

Під час розмноження рослин методом *in vitro* важливо підготувати їх до переходу на автотрофне живлення при пересадці в субстрат. Для цього зазвичай використовують середовища зі зниженим вмістом вуглеводів і мінеральних елементів, додаючи ауксини, які сприяють коренеутворенню. Перехід з асептичних умов до *in vivo* без попередньої адаптації часто призводить до в'янення і загибелі рослин, не пристосованих до умов відкритого ґрунту.

Таблиця 11.

Порівняння способів постасептичної акліматизації

Спосіб акліматизації	Початок коренеутворення (ex vitro), доба		Довжина коренів на 15-ту добу акліматизації, мм		Приживлюваність, %	
	Сорт					
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Волога камера (контроль)	12	14	4,2	1,6	69	61
Система періодичного підтоплення	10	13	6,4	5,2	72	60
Біореактор	3	4	14,3	9,8	86	84
НІР ₀₅	0,2	0,3	0,5	0,4	2,1	2,3

Щодо способу акліматизації у обох сортів найбільш ефективним було дорошування регенерантів у біореакторі. Так, у біореакторі початок утворення коренів на рослинах настав на 3-4 добу, тобто у 4 рази швидше ніж у вологій камері (контроль), приживлюваність зростала на 17-23 %, формувалася розвинута коренева система - довжина коренів збільшувалася на 8,2-10,1 см. За умов періодичного підтоплення спостерігалася тенденція покращення ризогенезу, формувалися корені більшої довжини, але за термінами початку ризогенезу та відсотком приживлюваності різниці з вологою камерою не спостерігалася.

Ключову роль в адаптації відіграє також вибір субстрату, до якого висаджують рослини після штучного живильного середовища. Основні вимоги до субстрату включають: здатність утримувати достатню кількість вологи та

повітря, довговічність, екологічну безпеку, можливість стерилізації, відсутність засолювання і легкість очищення від надлишку солей, низькі витрати на експлуатацію. Субстрат впливає на рослину як прямо, так і опосередковано через режим живлення. Водно-фізичні властивості субстратів впливають на поглинання мінеральних речовин, тому для кожного субстрату необхідно підбирати відповідний режим мінерального живлення.

Досліджено ефективність використання мінеральних (перліт, вермикуліт) та торф'яних субстратів для вирощування рослин в умовах закритого ґрунту від українських (Поліський універсальний, Екоплюс універсальний) та зарубіжних (Klasman TS 1, Jiffy) виробників.

Вермикуліт – це екологічний і чистий мінерал, що належить до групи гідрослюд. Субстрат Поліський універсальний – спеціальна суміш, виготовлена на основі якісних верхових і низинних торфів з додаванням кварцового піску та мікроелементів. Екоплюс універсальний – це спеціалізований, готовий до використання субстрат для рослин, виготовлений на основі торфів різного ступеня розкладання, з додаванням очищеного річкового піску та комплексного мінерального добрива, яке містить усі необхідні макро- та мікроелементи в доступній для рослин формі. Klasman TS 1- професійний субстрат з верхового торфу дрібної структури готовий до вживання, містить поверхнево-активну речовину для швидкого і легкого змочування, комплексне водорозчинне добриво, а також до складу субстратів входять мікродобрива. Торф'яні субстрати Jiffy виробляються в Естонії з високоякісного сфагнового торфу, містять добриво JBF 17-10-14 + ME в хелатній формі. Таблетована форма субстрату виготовляється з якісного торфу, спресована і поміщена в сіточку для зручності використання.

Для збалансування мінеральної складової досліджуваних субстратів у перліт і вермикуліт додавали мінеральну частину середовища за MS, в інші субстрати додавали мінеральні розчини солей з урахуванням їх початкового вмісту у субстраті, закладеного виробником.

Таблиця 12.

Вплив субстратів на акліматизацію *ex vitro* в умовах біореактора

Субстрат	Кількість регенерантів, що прижилися, %		Висота регенерантів, мм	
	Сорт			
	Неро	Вікінг	Неро	Вікінг
Вермикуліт (контроль)	82,1	76,4	95,6	81,9
Поліський універсальний	13,6	14,8	82,3	61,4
Екоплюс універсальний	54,6	51,7	99,1	80,3
Klasman TS 1	53,9	52,5	94,2	86,6
Jiffy	57,1	54,9	106,4	97,2
Jiffy таблетки	89,6	83,1	115,9	112,6
Перліт	91,7	81,4	103,1	90,7
НІР ₀₅	2,1	2,3	2,9	2,8

За результатами наших досліджень найкращі показники росту регенерантів спостерігалися на варіанті з використанням таблеток Jiffy - висота рослин перевищувала контрольні показники на 20,3 см по сорту Неро і на 30,7 см по сорту Вікінг, статистично значущою була також приживлюваність рослин у обох сортів (зроста на 6,7-7,5%). Інші субстрати на основі торфу виявилися неефективними порівняно з мінеральними субстратами щодо приживлюваності рослин.

Проте найкраще приживалися рослини, акліматизовані на перліті (мінеральна основа). Так, у сорту Неро показник збільшувався на 9,6 %, Вікінг – на 5 %. Якщо порівняти вартість однієї таблетки Jiffy (від 4 до 14 грн залежно від пакування) і вартість 1 л перліту (від 18 до 25 грн), то економічно доцільно використовувати перліт. До того ж перліт характеризується як субстрат, у якому не розмножуються личинки комах, не загниває і не хворіє коренева система.

ВИСНОВКИ

Враховуючи результати досліджень, проведених у лабораторії МКР ТМ «Тевітта» ТОВ «Агрофірма «Благодатне», щодо мікроклонального розмноження іронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг можна зробити такі основні висновки:

1. Використання скляних банок об'ємом 250 мл сумісно з пропіленовими кришками твіст забезпечило найкраще співвідношення об'єму ємності та біометричних параметрів сформованих регенерантів. Зменшення розрахункового об'єму ємностей впливало негативно на біометричні показники регенерантів обох сортів.

2. Оптимальним деконтамінантом був препарат Бланідас 300 (0,1%). У обох сортів кількість стерильних експлантів зростала втричі, кількість живих експлантів збільшувалася у 6,5 разів. Як додатковий деконтамінант найвищу ефективність мав препарат Казумін (125 мг/л), який збільшував відсоток стерильних експлантів у обох сортів на 19-22 %, кількість живих експлантів на 6-8 %.

3. Оптимальним варіантом живильного середовища для культивування *in vitro* Аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг було MS_{1/2} з додаванням кінетину 1 мг/л та індолілмасляної кислоти 1 мг/л. Відсутність у живильному середовищі цитокінінів пригнічує процес мультиплікації. За додавання у середовище 1 мг/л БАП формувалася міцний конгломерат з коротких пагонів, їх кількість зростала у сорту Неро у 4,9 разів, у сорту Вікінг у 3,5 разів. Спостерігалася тенденція кращої реакції сорту Неро на дію цитокінінів.

4. За порівняння різних комбінацій цитокінінів на біометричні характеристики та прояв вітрифікації у регенерантів встановлено ефективність сумісного застосування БАП (0,75)+Кінетин (0,25) – у конгломераті формувалося 4,1-4,4 шт. мікропагонів та кількість вітрифікованих рослин була найменшою – 0,4-1,3 %. Щодо сортових особливостей, спостерігалася тенденція до зменшення вітрифікації у рослин сорту Неро порівняно з сортом Вікінг.

5. Впродовж тривалого культивування (10 пасажів) на беззмінному середовищі спостерігалось зменшення коефіцієнта розмноження та збільшення кількості вітрифікованих рослин. Для мінімізації негативного впливу надлишку цитокінінів ефективним є сумісне застосування БАП 0,75 + Кінетин 0,25.

6. Встановлено, що кожне п'яте пасажування на «розвантажувальному» середовищі сприяло збільшенню коефіцієнта розмноження на 0,6 од. та водночас зменшенню кількості вітрифікованих рослин на 5,8-6,0 %.

7. Встановлено ефективність додавання у живильне середовище кінетину 1,0 мг/л за вирощування донорних рослин на показники ризогенезу потомства.

8. Щодо впливу тривалості культивування донорів експлантів на ризогенез потомства встановлено ефективність використання донорів віком 45 та 60 діб. У регенерантів, отриманих з таких донорів, раніше починалося коренеутворення та на 30-ту добу культивування формувалася розвинута коренева система з 4,0-4,3 шт корінців довжиною 43,9-50,7 см. Економічно доцільним є використання донорів віком 45 діб.

9. Найефективнішим способом акліматизації для обох сортів виявилось дорошування регенерантів у біореакторі. Процес ризогенезу починався на 3-4 добу, тобто у 4 рази швидше, ніж у вологій камері, приживлюваність підвищувалася на 17-23 %, довжина кореневої системи збільшувалася на 8 ,2-10,1 см.

10. Щодо вибору субстрату для акліматизації, найкращі показники росту регенерантів спостерігалися при використанні таблеток Jiffy. Висота рослин перевищувала контрольні показники на 20,3 см у сорту Неро і на 30,7 см у сорту Вікінг. Статистично значущою була приживлюваність рослин у обох сортів (зросла на 6,7-7,5%). Однак найкраща приживлюваність була зафіксована у рослин, акліматизованих на перліті (мінеральний субстрат): для сорту Неро показник збільшився на 9,6%, а для сорту Вікінг – на 5 %.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

На підставі проведених досліджень для МКР аронії чорноплідної сортів Неро та Вікінг рекомендуємо:

1. Використання скляних банок об'ємом 250 мл сумісно з пропіленовими кришками твіст
2. Для знезаражування донорних рослин використовувати препарати Бланідас 300 (0,1%) та додатковий деконтамінант Казумін (125 мг/л).
3. Для отримання культури тканин використовувати середовище MS_{1/2} (зі зменшеним удвічі умістом макросолей) із додаванням кінетину 1 мг/л та індолілмасляної кислоти 1 мг/л.
4. На етапі мультиплікації додавати у живильне середовище сумісно цитокініни БАП 0,75 + Кінетин 0,25, за тривалого культивування (впродовж 6 місяців і більше) застосовувати кожне п'яте «розвантажувальне» середовище.
5. На етапі ризогенезу потомства рекомендується додавати у живильне середовище 1,0 мг/л кінетину, використовувати 45-ти добові донори експлантів
6. Адаптацію проводити в умовах біореактора з використанням субстрату мінерального походження перліт.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Меженський В.М., Меженська Л.О., Мельничук М.Д., Якубенко Б.Є. Нетрадиційні плодові культури (рекомендації з селекції та вирощування садивного матеріалу). Національний університет біоресурсів і природокористування України. К.: Фітосоціоцентр, 2012. 80 с.
2. Стюрко М. Мікроклональне розмноження як складова сучасних технологій рослинництва. Сучасні технології вирощування екологічно безпечної плодоовочевої продукції. Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 90-річчю від дня народження видатної селекціонерки часнику Лідії Ліщак. 28-29 березня 2024. Львів: ЛНУП. С. 124-126.
3. Krivoruchko O.V. et al. The determination of content of anthocyanins and tannins In fruit of aronia melanocarpa. Medical and Clinical Chemistry. 2018. 1. P. 71–75. DOI: 10.11603/mcch.2410- 681X.2018.v0.i1.87563 .
4. Мацкевич В.В., Подгасцький А.А., Філіпова Л.М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. Біла Церква: БНАУ, 2019. 85 с.
5. Almokar H. M. M., & Pirlak L. (2018). Propagation of Aronia (Aronia melanocarpa) with tissue culture. Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences, 32(3), 549-558. DOI: 10.15316/SJAIFS.2018.136.
6. Rusea, I., Popescu, A., Hoza, D., Isac, V., & Oprea, M. I. (2022). In vitro rooting and acclimatization ex vitro of Aronia melanocarpa cv. 'Nero'.
7. Гребенюк В.М., Балабак А.Ф. Особливості адвентивного коренеутворення у стеблових живців сортів аронії чорноплідної (Aronia Melanocarpa (Michx.) Elliott) залежно від впливу біологічно активних речовин. «Агробіологія», 2024. № 1. С. 277-284.
8. Petrovic D.M., Jacimovic-Plavšic M.M. Aronia melancarpa and propagation in vitro. Acta Hortic. 1992, 300. P. 133–136. DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.300.16.

9. Almokar H.M.M., Pirlak L. Propagation of Aronia (*Aronia melanocarpa*) with tissue culture. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2018. 32(3). P. 549–558. DOI: 10.15316/SJAIFS.2018.136.
10. Borsai, O., Clapa, D., Fira, A., Hârta, M., Szabo, K., Dumitraş, A.F. and Pamfil, D. (2021). In vitro propagation of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. *Acta Hortic.* 1308, 213-222 DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1308.30 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1308.30>.
11. Celebi-Toprak F., Alan A.R. A successful micropropagation protocol for three aronia (*Aronia melanocarpa*) cultivars. *Acta Hortic.* 2020 1285. P. 173–176. DOI: 10.17660/ActaHortic. 2020.1285.27–6.
12. Литвиненко Я.О. Застосування біотехнологічних методів у розсадництві аронії чорноплідної (*Aronia Melanocarpa MICHX.*). Молодь – аграрній науці і виробництву. Інноваційні технології в агрономії, лісовому та садово-парковому господарстві, землеустрої, електроенергетиці: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти, 24 квітня 2024 року. Біла Церква: БНАУ. С.30-31.
13. Литвиненко Я.О. Ефективність стерилізуючих агентів для одержання асептичної культури *Aronia melanocarpa* Збірник тез доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції магістрантів і молодих дослідників "Наукові пошуки молоді у ХХІ столітті", яка відбудеться 30 жовтня 2024 року. Біла Церква: БНАУ. С. 30-31.
14. Мацкевич В.В., Кравченко Н.В., Подгаєцький А.А. та ін. Мікроклональне розмноження рослин: навчально-методичний посібник. Суми, 2023. 215 с.
15. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Подгаєцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.
16. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Олешко О.Г. Фізіологія та біотехнологія рослин : підручник. Біла Церква : БНАУ, 2022. 427 с.

17. Şuţan, N. A., Isac, V., Duminică, C., & Popescu, A. (2017). Studies on the in vitro micropropagation ability of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. *Current Trends in Natural Sciences* Vol, 6(11), 85-92.
18. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М. Основи біотехнології рослин: Методичні вказівки для забезпечення самостійного вивчення курсу студентами денної та заочної форм навчання за кредитно-модульною системою організації навчального процесу. Біла Церква: БНАУ, 2013. 47 с.
19. Основи біотехнології рослин: методичні вказівки для практичних занять та самостійної роботи за кредитно-трансферною системою організації навчального процесу для здобувачів вищої освіти денної форми навчання / Ю.О. Куманська, М.В. Лозінський, В.Я. Сабадин, Ж.В. Вдовиченко, Г.Л. Устинова. Біла Церква, 2020. 71 с.
20. Біотехнологія в рослинництві: методичні вказівки для практичних занять та самостійної роботи для здобувачів вищої освіти денної форми навчання / Ю.О. Куманська, М.В. Лозінський, Л.А. Бурденюк-Тарасевич, І.М. Сидорова. Біла Церква, 2020. 128 с.
21. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Антіпов І.А. Біотехнологія. К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. 350 с.
22. Сатарова Т.М., Абраїмова О.Є., Вінніков А.І., Черенков А.В. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.
23. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.
24. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014. 247 с.
25. Мацай Н.Ю. Основи біотехнології. Підручник. ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. 153 с.
26. Балашова Г.С., Котова О.І., & Котов Б.С. (2016). Мікроклональне розмноження оздоровлених біотехнологічними методами рослин картоплі in vitro. *Зрошуване землеробство*, (66), 111-113.

27. Мельничук М.Д., Григорюк І.П., Новак Т.В., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Спиридонов В.Г., Ключащенко А.А., Антіпов І.О., Оверченко В.В. Біотехнологія рослин. Практикум. К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. 215 с.
28. Смағали А., Сапарбаева Н. А. (2019). Introduction to culture in vitro of Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott.). Вестник Карагандинского университета. Серия: Биология. Медицина. География, 94(2), 130-135.
29. Abduganiyeva D., Ruziyev K., Khasanov N., and Urazova R. Optimum conditions for primary callus production in microclonal propagation of *Aronia melanocarpa* (Michx) Elliott. BIO Web of Conferences 130, 01012 (2024) <https://doi.org/10.1051/bioconf/202413001012>.
30. Polat, M., & Eskimez, I. (2022). The effects of different hormone combinations on in vitro micropropagation of aronia (*Aronia Melanocarpa* (michx.) elliot). Fresenius Environmental Bulletin, 31(01A), 1219-1227.
31. Celebi-Toprak, F. and Alan, A.R. (2018). A successful micropropagation protocol for three aronia (*Aronia melanocarpa*) cultivars. XXX International Horticultural Congress 12-16 August 2018, Istanbul, Turkey, 08.12.2018. 235-237.
32. Singh, A. (2015). Micropropagation of plants. Plant biology and biotechnology: volume II: plant genomics and biotechnology, 329-346.
33. Колесник А.В., Сікура А.О., Гедзур Т.І. Лабораторний практикум з біотехнології. Методичні рекомендації до лабораторних робіт з циклу «Розмноження рослин in vitro» для студентів біологічного факультету денної та заочної форми навчання. Ужгород, 2023. 35 с.
34. Kundu, S., Sindhusa, P., & Kumar, A.. Micro-propagation techniques in horticultural crops and various factors affecting it: A review. Modern Phytomorphology. 2021. 15: 137–141.
35. Sowndarya K., Manorama K. Biotechnology: Clonal Propagation - Introduction to Vegetative Propagation Agryculture and Food, 2020. Vol. 2. Issue 9. 128-131. Article ID: 31443.
36. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Основи біотехнології рослин. Методичні вказівки для забезпечення самостійного вивчення курсу студентами денної

- та заочної форм навчання за кредитно-модульною системою організації навчального процесу. Біла Церква: БНАУ. 2013. 52 с.
37. Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the twenty-first century. *Plant cell culture protocols*, 17-46.
38. Rusea I., Popescu A., Isac V., ȘUȚAN A. N., Hoza D. (2018). Adventitious shoot regeneration from petiole explants in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, 62.
39. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. К.: Наукова думка, 2005. 271 с.
40. Liu FH, Liu J and Dong M (2016) Ecological Consequences of Clonal Integration in Plants. *Front. Plant Sci.* 7:770. doi: 10.3389/fpls.
41. Ekinici, H., Saskin, N., Korkmaz, Ş., & Aydinlik Y. (2024). The effect of sodium nitroprusside on the vegetative development of *Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliot under in vitro conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 52(1), 13542-13542.
42. Сакало В.Д. Метаболізм сахарози і його регуляція в рослинах з різним складом запасних вуглеводів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: 03.00.12 «Фізіологія і біохімія рослин». К., 2004. 41 с.
43. Власенко М.Ю. Вельямінова-Зернова Л.Д., Мацкевич В.В. Фізіологія рослин з основами біотехнології. Біла Церква, 2006. 504 с.
44. Pospíšilová J., Ticha I., Kadleck P., Yaisel D. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 1999. V42. №4. P.481-497.
45. Деревинська Т.І., Зеленіна Г. А., Любимова Н. С. Проблеми і перспективи вирощування арніки на півдні України з використанням мікроклонального розмноження. Збірн. наук. праць „Фальцфейнівські читання”. Херсон: Терра. 2005. Т. 1. С. 117-118.
46. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.

47. Зеленіна Г.А. Мікроклональне розмноження та особливості водного обміну регенерантів *Arnica foliosa*. Вісник Одеського національного університету. 2005. Т. 9. Вип.5. С. 7-11.
48. Таран О.П. Регенераційна здатність рослин картоплі за дії абіотичних чинників у культурі *in vitro* та *ex vitro*. Автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. Наук: спец. 03.00.12 «Фізіологія рослин». К., 2011. 21 с.
49. Weiss D., Ori N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol.* 2007. P.1443-1446.
50. Wareing P.F. Absciscic acid as a natural growth regulator. *Phil. Trans. Roy. Soc. London.* B. 1978. 284. P. 483-498.
51. Мацкевич В.В. Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису: дис. д-ра с.-г. наук: 06.01.05. Суми, 2020. 478 с.
52. Кучерява О. В. Вплив різних субстратів та вихід саджанців фундука за технологією *in vitro* в умовах Півдня України: кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня «Магістр». Спец. 203 «Садівництво та виноградарство». ОДАУ. Одеса, 2021. 64 с.
53. Бобошко-Бардин І. М. Оптимізація складу субстрату для адаптування саджанців-регенерантів магнолії кобус (*Magnolia kobus* DC.). Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Лісівництво та декоративне садівництво, 2015. 219. С. 205-212.
54. Попович Г.Б., Садовська Н.П. Методичні рекомендації до проведення лабораторних занять та виконання самостійної роботи з навчальної дисципліни «Малопоширені плодові і ягідні культури» (для студентів спеціальності 203 – Садівництво та виноградарство). Ужгород, 2023.
55. Меженський В.М., Меженська Л. О. Різниця між аронією чорноплодою (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) й аронією Мічуріна (*Aronia mitschurinii* A. K. Skvortsov & Maitulina) за морфометричними показниками листків та плодів. Світові рослинні ресурси: стан та перспективи розвитку: матеріали II

- Міжнарод. наук.-практ. конф. (3 листопада 2016 р., м. Київ) / Укр. ін-т експертизи сортів рослин. Вінниця: Нілан-ЛТД. 2016. С. 55–57.
56. POWO (Plants of the World Online). (2023). Royal Bot. Gard. Kew. URL: <https://powo.science.kew.org/> (Accessed 4 June 2023).
57. Ковальчук С.П., Меженський В.М. Що культивують садівники — аронію чи горобиноаронію? Етноботанічні традиції в агрономії, фармації та садовому дизайні: матеріали VI міжнародної наукової конференції, присвяченої Року Незламності України (м. Умань, 5–8 липня 2023 року). Умань: Національний дендрологічний парк “Софіївка” НАН України, 2023. С. 155-160.
58. Engin, S. P., Boz, Y., Mert, C., Fidanci, A., & İkcini, A. (2018, April). Growing aronia berry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot). In International Gap Agriculture & Livestock Congress, Sanlurfa (pp. 25-27).
59. Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., & Luczkiewicz, M. (2010). Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food*, 13(2), 255-269.
60. Moskalets T. Z., Moskalets V. V., Vovkohon A.H., Shevchuk O.A., Matviichuk O.A. Modern breeding and cultivation of popular fruits and berries in Ukraine. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2019. 9(3). P. 180-188.
61. Криворучко О. В., Котов А. Г., Самойлова В. А. та ін. Визначення вмісту антоціанів і танінів у аронії чорноплідної плодах. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20. № 1. С. 71–75.
62. Гудзенко А. В., Власенко С. О. Вивчення компонентного складу летких сполук плодів горобини чорноплідної (*Aronia melanocarpa* Michx.) з використанням методу газової хроматографії з мас-детекцією. *Збірник наукових праць співробітників Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика*. 2019. Вип. 33. С. 105–111.
63. Šnebergrová, J., Čížková, H., Neradová, E., Kapci, B., Rajchl, A., Voldřich, M., 2014. Variability of Characteristic Components of Aronia. *Czech J. Food Sci.*, 32: 25-30.

64. Jurendić, T., & Ščetar, M. (2021). Aronia melanocarpa products and by-products for health and nutrition: A review. *Antioxidants*, 10(7), 1052.
65. Banjari, I., Misir, A., Šavikin, K., Jokić, S., Molnar, M., De Zoysa, H. K. S., & Waisundara, V. Y. (2017). Antidiabetic effects of Aronia melanocarpa and its other therapeutic properties. *Frontiers in Nutrition*, 4, 53.
66. Гребенюк В.М., Балабак А.Ф. Використання аронії чорноплідної (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) у ландшафтному дизайні Правобережного Лісостепу України. Збірник наукових праць Уманського НУС. 2023. Вип. 103 (1). С. 172–181Н.
67. Plant cell and tissue culture. Phytopathology. Biochemicals. Catalogue 2010-2012. Catalogue edited by drs/ F.T.M.Kors. Duchefa Biochemie B. Vol. 194 p. URL: http://http://brochure.duchefa-biochemie.com/Duchefa_catalogus_2010_2012/.
68. Çelik Et Al. , "Growth-Development, Yield and Quality Characteristics of Aronia Varieties Grown in Pots," Uluslararası tarım araştırmalarında yenilikçi yaklaşımlar dergisi (Online) , vol.6, no.3, pp.246-254, 2022.
69. Matskevych V.,Yukhnovskyi V., Filipova L, Kravchenko N., Tupchii, Matskevych Yu. (2024). Photoautotrophic microclonal propagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.) variety Delniwa. *Folia Forestalia Polonica, Series A - Forestry*. 66(3). 183-194